

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2000-502055

(P2000-502055A)

(43)公表日 平成12年2月22日(2000.2.22)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テマコード(参考)
C 0 7 K 7/23	ZNA	C 0 7 K 7/23	ZNA
A 6 1 P 35/00		A 6 1 K 31/00	6 3 5
A 6 1 K 31/704		31/70	6 1 1
38/00		C 0 7 H 15/252	
C 0 7 H 15/252		A 6 1 K 37/02	
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁)	

(21)出願番号 特願平9-520123
 (86)(22)出願日 平成8年11月14日(1996.11.14)
 (85)翻訳文提出日 平成10年5月27日(1998.5.27)
 (86)国際出願番号 PCT/EP96/05029
 (87)国際公開番号 WO97/19954
 (87)国際公開日 平成9年6月5日(1997.6.5)
 (31)優先権主張番号 08/562, 652
 (32)優先日 平成7年11月27日(1995.11.27)
 (33)優先権主張国 米国(US)

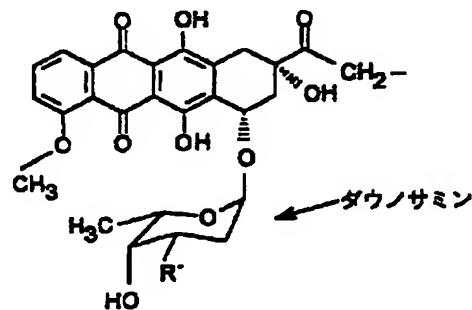
(71)出願人 アスタ メディカ アクチエンゲゼルシャフト
 ドイツ連邦共和国 D-01277 ドレスデン アンデアピカルディー 10
 (72)発明者 アンドリュウ ヴィ シャリー
 アメリカ合衆国 70112-2699 ルイジアナ ニューオーリーズ テュレーン アヴェニュー 1430 テュレーン ユニヴァーシティ メディカル センター スクール オブ メディシン内
 (74)代理人 弁理士 矢野 敏雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 標的細胞毒性アントラサイクリン類似体

(57)【要約】

本発明は、標的抗癌アントラサイクリン誘導体化学分野に関する。更に詳細には、本発明は、ドキソルビシン(DOX)又はペプチドホルモン、例えばLH-RH、ボンベシン及びソマトスタチンの類似体と共有結合したダウノサミン変性誘導体(DM-DOX)に関する。これらの共有結合体は、ペプチドホルモン類似体の受容体を有する種々の腫瘍を標的とする。本発明の化合物は、一般式: $Q^{1-4}-O-R-P$ で表わされ、式中、Qは、一般式 (II)



(II)

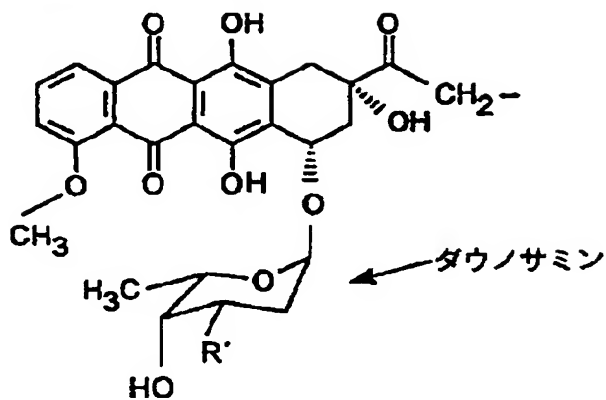
を有し、 Q^{1-4} は14位に側鎖を有するQ基を表わし、RはH又は $-C(O)-(CH_2)_n-C(O)-$ であり、 $n=0\sim7$ であり、 R' は、 NH_2 又は芳香族飽和又は部分飽和5員又は6員の複素環式化合物(これは、環窒素少なくとも1個を有し、場合により前記環の隣接炭素原子と結合して双環系を形成するプタジエン基を有する)であり、Pは、H又はペプチド成分、有利にはLH-RH、ソマトスタチン又はボンベシン類似体である。 R' が NH_2 である場合には、R及びPはH以外のもの

【特許請求の範囲】

1. 式



[式中、Qは、詳細な化学構造



(II)

を有し、ここで、 $-R-$ はH又は $-C(O)-(CH_2)_n-$ 、 $-C(O)-$ であり及び $n=0\sim7$ であり、 R' は、 NH_2 又は少なくとも1個の環窒素を有する芳香族飽和又は水素添加された5又は6員の複素環式化合物及び前記の環の隣接炭素原子と結合して双環系を形成するブタジエン基を有するような複素環から成る群から選択されたものであり、 P は、H又はペプチドであり、 R' が NH_2 である場合には、 R 及び P はH以外のものであり、 R 及び P がHである場合には、 R' は NH_2 以外のものである]の化合物。

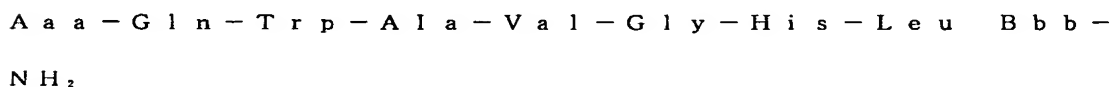
2. 式中の R' が、 NH_2 、ピロリジン-1-イル

、イソインドリン-2-イル、3-ピロリン-1-イル、3-ピロリドン-1-イル、2-ピロリン-1-イル、3-ピペリドン-1-イル、1,3-テトラヒドロピリジン-1-イルから成る群から選択されたものであり、 P は P_1 、 P_2 及び P_3 であるり、その際、 P_1 は、式： $Aaa-Bbb-Ccc-Ser-Tyr-D-Lys(Xxx)-Leu-Arg-Pro-Ddd$ (式中、 (Xxx) は水素、 A_2Bu 又は A_2Pr であり、その際、 Aaa が Glp である場合には、 Bbb は His であり、 Ccc は Trp であり、 Ddd は $Gly-NH_2$ であり、 Aaa が $Ac-D-NaI(2)$ である場合には、 Bbb は $D-Phe(4C$

I) 又はD-Pheであり、CccはD-Pai (3) 及びD-Trpであり、DddはD-Ala-NH₂であり；Aaa-Bbb-CccがAcである場合には、Dddは-NH-CH₂-CH₃であり、基Q^{1'}-O-R-はD-Lys基の遊離アミノ基と又は(Xxx)の所に存在する場合には、A₂Bu又はA₂Prの遊離アミノ基の少なくとも1個とカルボキサミド結合を形成する)のLH-RH類似体から成る群から選択したものであり、P₂は、式



(式中、AaaがD-Pheである場合には、BbbはTyrであり、CccはValであり、DddはThr又はTrpであり；AaaがD-Trpである場合には、BbbはPheであり、Ccc及びDddはThrであり、基Q^{1'}-O-R-はAaa基の末端アミノ基とカルボキサミド結合を形成する)のソマトスタチンの類似体であり、P₃は、式：



(式中、Aaaはゼロ、D-Tpi又はD-Pheであり、Bbbは(CH₂-NH)Leu、(CH₂-NH)Phe又は(CH₂-NH)Trp又は(CH₂-N)Tacであり、基Q^{1'}-O-R-は、存在するAaa基の末端アミノ基又は存在しない場合にはGlnとカルボキサミド結合を形成する)のボンベシン拮抗物質類似体である、請求項1に記載の化合物。

3. n=3である請求項2に記載の化合物。

4. 式中のR'がNH₂である請求項3に記載の化合物。

5. 式中のR'が2-ピロリジン-1-イルである請求項3に記載の化合物。

6. 式中のPがP₁である請求項4に記載の化合物。

7. 式中のPがP₁である請求項5に記載の化合物。

8. 式中のPがP₂である請求項4に記載の化合物。

9. 式中のPがP₂である請求項5に記載の化合物。

10. 式中のPがP₃である請求項4に記載の化合物。

11. 式中のPがP3である請求項5に記載の化合物。

12. 式中の-R及び-Pが両方とも-Hであり、R'がNH₂以外のものである請求項1に記載の化合物。

13. -R'がピロリジン-1-イルである請求項12に記載の化合物。

14. -R'がイソインドリン-2-イルである請求項12に記載の化合物。

15. -R'が3-ピロリン-1-イルである請求項12に記載の化合物。

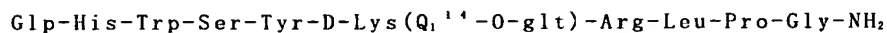
16. -R'が3-ピロリドン-1-イルである請求項12に記載の化合物。

17. -R'が2-ピロリン-1-イルである請求項12に記載の化合物。

18. -R'が3-ピロリドン-1-イルである請求項12に記載の化合物。

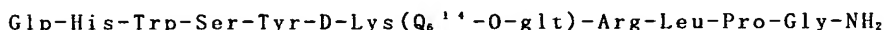
19. -R'が1,3-テトラヒドロピリジン-1-イルである請求項12に記載の化合物。

20. 式



[式中、Q₁¹⁴はドキシソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

21. 式



[式中、Q₆¹⁴は3'-デアミノ-3'-(2"-ピロリン-1"-イル)-ドキシソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

22. 式



[式中、Q₁¹⁴はドキシソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

23. 式



[式中、Q₆¹⁴は3'-デアミノ-3'-(2"-ピロリン-1"-イル)-ド

キソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

24. 式



[式中、 Q_1^{14} はドキシソルピシン-14-イルである]

]の請求項1に記載の化合物。

25. 式



[式中、 Q_6^{14} は3'-デアミノ-3'-(2"-ピロリン-1"-イル)-ドキシソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

26. 式



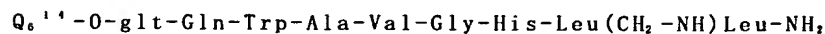
[式中、 Q_1^{14} はドキシソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

27. 式



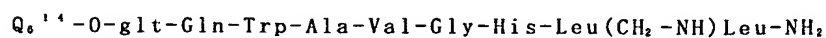
[式中、 Q_6^{14} は3'-デアミノ-3'-(2"-ピロリン-1"-イル)-ドキシソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

28. 式



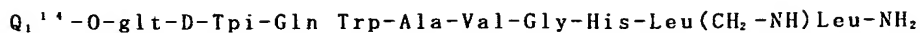
[式中、 Q_6^{14} はドキシソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

29. 式



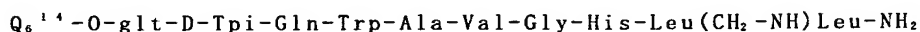
[式中、 $Q_{1'}$ は3'-デアミノ-3'-(2"-ピロリン-1"-イル)-ドキシソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

30. 式



[式中、 $Q_{1'}$ はドキシソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

31. 式



[式中、 $Q_{1'}$ は3'-デアミノ-3'-(2"-ピロリン-1"-イル)-ドキシソルピシン-14-イルである]の請求項1に記載の化合物。

32. 請求項1に記載の化合物及びその製薬学的に認容性のキャリアから成る組成物。

33. 前記治療を必要とする哺乳類に有効量の請求項1に記載の化合物を投与することからなる、哺乳類における癌の治療方法。

34. 乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、前立腺癌、膵臓癌及び結腸癌を含めて、LH-RHの受容体を有する種々のヒトの腫瘍を治療するための請求項20及び21に記載の化合物の使用。

35. 乳癌、胃癌、膵臓癌、結腸直腸癌、前立腺癌、スモール細胞及び非スモール細胞肺癌、腎細胞癌、骨肉腫及び脳腫瘍を含めて、ソマトスタチン類似体の受容体を有する種々のヒトの腫瘍を治療するための請求

項22から27に記載の化合物の使用。

36. 乳癌、胃癌、膵臓癌、結腸直腸癌、前立腺癌、スモール細胞及び非スモール細胞肺癌及び脳腫瘍を含めて、GRP及びボンベシン様ペプチドの受容体を有する種々のヒトの腫瘍を治療するための請求項28から31に記載の化合物の使用。

37. α , β -又は α , γ -ヒドロキシ第一アミンの第一アミノ基の窒素を、環中に5と6個の原子を有する一不飽和窒素の窒素を含有する複素環式化合物の窒素に変える方法において、連続工程:

a) 前記ヒドロキシアミンを、アルデヒド炭素、ハロゲンを含む炭素及びアルデヒド炭素とハロゲンの間に CH_2 、 CH_2CH_2 及び OCH_2 から成る群から選択された2又は3個の基を含む、過剰のハロアルデヒドで処理し、

b) ヒドロキシアミンに対して過剰の有機塩基を添加し、

c) 前記塩基を弱酸で中和し、

d) 希酸水溶液で処理する、

から成ることを特徴とする、前記の方法。

38. 工程 a) を中性反応不活性有機溶剤中で行う、請求項30に記載の方法。

39. 工程 a) を極性非加水分解反応の不活性有機溶剤中で行う、請求項30に記載の方法。

40. 溶剤がジメチルホルムアミドである、請求項30に記載の方法。

41. アルデヒドをオメガブロム-及びオメガヨードブチルアルデヒド及びバレルアルデヒドから成る群から選択する、請求項30に記載の方法。

【 発 明 の 詳 細 な 説 明 】

標的細胞毒性アントラサイクリン類似体

発明の背景

本発明は、一部政府の援助で行われた。政府は本出願の一定の権利を有する。

発明の属する分野

本発明は、標的抗癌剤であるアントラサイクリン誘導体化学分野に属する。更に詳細には、本発明は、ドキソルピシン (DOX) 又は、ペプチドホルモン類似体、例えば LH-RH、ボンベシン及びソマトスタチンと共有結合したそのダウノサミン変性誘導体 (DM-DOX) に関する。これらの共役結合体は、ペプチドホルモン類似体用の受容体を有する種々の腫瘍を標的とする。

先行技術についての説明

第 6 位に細胞毒性基を有する LH-RH 類似体が、シャーリー (Schally)、ジャナキー (Janaky) 及びバジャツ (Bajusz) の欧州特許 0 450 461 号明細書 (grant publication、1995 年 9 月 6 日) に記載されている。

生殖腺刺激ホルモンを破壊する GnRH (LH-RH) 類似体がネット (Nett) 及びグロウド (Glode) の WO 90/09799 号明細書 (1990

年 9 月 7 日発行) に記載されている。この明細書には、性腺刺激ホルモンを破壊し、従って性ホルモンによる癌を治療するための LH-RH の類似化合物に結合したリシンの様な毒素が記載されている。LH-RH ドキソルピシン誘導体についても、リンキングの化学的詳細はないが、記載されている。

細胞毒性ソマトスタチン類似体が、シャーリーその他の 1990 年 4 月 6 日出願の米国特許、1993 年 7 月 15 日再出願の出願番号 08/076846 号明細書に記載されている。

Anti-Cancer Drugs、第 5 巻、115~130 頁 (1994 年) の A. V. シャリーの論文に、LH-RH、ボンベシン又はソマトスタチンの類似体の非常に多様な腫瘍の細胞膜上に受容体が存在することについて詳説されている。

G. ウェックベッカー (Weckbecker) は、Farmac. Ther. 第60巻、245～264頁(1993年)の論文で、正常組織及び腫瘍組織上のいくつかでソマトスタチン類似体の受容体及び受容体サブタイプの存在を示す文献を幾つか列記している。

ボンベシン様ペプチド及び種々の正常組織及び腫瘍組織上のボンベシン/GRP受容体の存在について、N. バネット (Bunnett) の論文 [Gut Peptides: Biochemistry and

Physiology 423～445 (1994) Ed.: J. Walsh and G. J. Dochray, Raven Press, ニューヨーク] 及びE. スピンデル (Spindell) の論文 [Recent Progress in Hormone Research 48 (1993) (Academic Press)] で討論されている。

ドキソルビシン (DOX) は、現時点では、最も頻用されており、非常に有効な抗癌剤である。しかし、ある特定の腫瘍はこれに全く反応せず、従ってその使用は、多薬剤耐性 (MDR) 及び慢性治療の結果である心毒性や好中球減少症が原因となって制限されている。これらの欠点を克服し、抗腫瘍作用を有する有力なアントラキノン構造抗生物質を開発するために、種々のキャリア巨大分子と結合したその標的類似体を含めて、何千もの合成誘導体が発表されている。

DOX及びその類似体の歴史の多くは、“Adriamycin” [David W. Henry, ACS Symposium Series, No. 30, Cancer Chemotherapy, American Chemical Society 15～57頁 (1976年)] 及び本: Doxorubicin, Federico Arcamone, Academic Press (1981年) に記載されている。

抗腫瘍作用を有する、高活性の、アルキル化、非交叉耐性の、3'-デアミノ-3'- (3"-シアノ-4"-モルホリニル) -DOX及びその誘導体が、モシャー (Mosher) その他による米国特許第4464529号明細書 (19

84年8月7日)に記載されている。これら“強力に有効なモルホリニルアントラキノ”の合成及び生物学的評価は、J. Med. Chem. 第27巻、638～645頁(1984年)にも記載されている。

Proc. Natl. Acad. Sci. USA第88巻、4845～4849頁(1991年6月)中で、ガオ(Gao)その他が、ダウノルビシン誘導体によるDNA配列のホルムアルデヒド媒介アルキル化を詳説している。

潜在性アルキル化置換基を有するアントラキノ類似体が、J. Med. Chem. 第35巻、3208～3214頁(1992年)に記載されている。

DOXのダウノサミン窒素をアルキル化するために α , ω -ジオード化合物を使用すること、従って新規モルホリニルDOX誘導体の生成が、1989年12月12日、Pharmacia Carlo Erba提出の欧州特許EP第434960号明細書に記載されている。

N-トリフルオルアセチルアドリアマイシン¹⁴-O-ヘミグルタレート及びヘミアジペートが、改善さ

れた水溶性を有するN-トリフルオルアセチルアドリアマイシン¹⁴-O-バレレート(AD-32)の類似体として、イスラエル(Israel)その他、米国特許4299822号明細書(1981年11月10日)に記載されている。

ホルトン(Horton)及びプリーベ(Priebe)(J. Antibiotics, XXXVI, 1211～1215)は、14-OH親類似体と比較して抗癌活性があまり異ならない別のアントラサイクリンの14-O-エステルを幾つか記載している。

標的化学療法薬を開発する際に、下記の目標事項が求められる：

1. 標的到達までのキャリア分子と化学療法薬の間の安定な結合。
2. 結合体内でのキャリア分子の生物学的特性の保持、例えば結合特性保持。
3. 結合体内での化学療法薬の薬理学的活性の保持、例えば細胞毒性保持。
4. 結合の結果として、非共役結合基に比較して活性がより強力であり、及び／又は末梢毒性が低い類似体の製造。

DOXのダウノサミン基のNaIO₄の酸化、引き続いてのキャリア分子の第

ーアミンを含む還元アルキル化によるDOXの共役結合は、セラ (S e l a) その他の米国特許第4263279号明細書 (1981

年4月21日)中に記載されている。

シスーアコニット酸スペーサーは、B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . (1981年)第102巻、1048～1054頁に記載されているように、ダウノサミン窒素をpH-感応性結合を有する巨大分子キャリアと結合させるために使用された。

14-ブロモダウノルピシンと蛋白質又はポリ-L-アミノ酸との間のエステル結合及びC-N結合の形成が、ズニノ (Z u n i n o) その他著 (1981年) T u m o r i 第67巻、521～524頁及び (1984年) E u r . J . C a n s e r C l i n . O n c o l . 第20巻、421～425頁に記載されている。

モルホリノーDOX (DOXの高活性の、ダウノサミン変性類似体) は、B i o c o n j u g a t e C h e m i s t r y 1990 (5)、325～330頁に記載されているように、加水分解可能な (リゾノモトロープ、pH感受性) ヒドラゾン結合 (細胞毒性剤のC-13オキソ官能基を含む) を介して抗体と共役結合された。

酵素による変性に対するロイシン残基のカルボキサミド結合の感応性を使用して、“スペーサーアーム”ペプチド、有利にはA l a - L e u - A l a - L e u を含有するDOXを共役結合させることに成功したが

、その際、カルボキシ末端L e u がDOX中のダウノサミン窒素をアシル化し、アミノ末端A l a がジカルボン酸スペーサーを介してキャリアと結合される (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1982年、79、626～629頁に記載されているように)。

DOXのダウノサミン窒素は、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1992年、89、972～976頁に記載されているように、グルタミン酸スペーサーによりアシル化され、細胞毒性が著しく損なわれてLH-RH類似体

に結合された。

種々のヒトの腫瘍を治療するための本発明による化合物の使用に関するその他の文献は下記のものである：

1. Schally et. al. (1996) in Treatment with GnRH Analogs: Controversies and Perspectives, eds. Filicori, M. & Flamigni, C. (Parthenon, Camforth, U. K). pp. 33-44.
2. Nagy et. al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 7269-7273.
3. Yano et. al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 7090-7094.
4. Rekasi et. al. (1993) Endocrinology 132(5) 1991-2000.
5. Srkalovic et. al. (1990) Cancer Res. 50, 1841-1846.
6. Emons et. al. (1993) Cancer Res. 53, 5439-5446.
7. Emons et. al. (1993) Journal of Clin. Endocrin. and Metabol. 77(6) 1458-
8. Schally, A. V. (1988) Oncological applications of somatostatin analogs. Cancer Res. 48, 6977-6985.
9. Schally et. al. (1994) International Journal of Pancreatology 16, 277-280.
10. Srkalovic et. al. (1990) Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 70(3), 661-669. 4 Pinski et. al. (1994) Int. J. Cancer 57, 574-580.
11. Radulovic et. al. (1992) Cancer Letters 62, 263-271.
12. Qin et. al. (1995) Int. J. Cancer 60, 694-700.
13. Radulovic et. al. (1992) P. S. E. B. M. 200, 394-401.
14. Radulovic et. al. (1994) Acta Oncologica 33(6) 693-701.
15. Pinski et. al. (1993) Cancer Letters 71, 189-196.
16. O'Byrne et. al. (1994) Eur. J. of Cancer 30A(11) 1682-1687.
17. Pinski et. al. (1994) Br. J. of Cancer 70, 886-892.
18. Pinski et. al. (1994) Cancer Res. 54, 5895-5901.
19. Pinski et. al. (1996) Int. J. Cancer 65, 870-874.
20. Banks et. al. (1992) Anticancer Drugs. 3, 519-523.
21. Reubi and Kvolts (1992) Cancer Res. 52, 6074-6078.)

22. Schally et.al. (1994) International Journal of Pancreatology 16, 277-280.
23. Halmos et.al. (1995) Cancer Res. 55, 280-287.
24. Halmos et.al. (1994) Cancer Letters 85, 111-118.
25. Qin et.al. (1994) J. Cancer Res. Clin. Oncol. 120, 519-528
26. Qin et.al. (1994) Cancer Res. 54, 1035-1041.
27. Qin et.al. (1995) Int. J. Cancer 63, 257-262.
28. Reile et.al. (1994) The Prostate 25, 29-38.
29. Pinski et.al. (1994) Int. J. Cancer 57, 574-580.
30. Radulovic et.al. (1992) P. S. E. B. M. 200, 394-401.
31. Radulovic et.al. (1994) Acta Oncologica 33(6) 693-701.
32. Pinski et.al. (1993) Cancer Letters 71, 189-196.
33. Pinski et.al. (1994) Br. J. of Cancer 70, 886-892.
34. Pinski et.al. (1994) Cancer Res. 54, 5895-5901.)

参考文献は全て本明細書に参考までに包含される。

発明の要約

本発明の化合物は、アントラサイクリン細胞毒性剤、例えばDOX又はDM-DOXから成る新規の標的細胞毒性ペプチドホルモンであり、これらはペプチドホルモン、例えばLH-RH類似体、ボンベシン及び

ソマトスタチンと共役結合している。これらの細胞毒性ペプチドホルモン共役結合体は、共役結合体の特異的な受容体を有する腫瘍、例えば乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、前立腺癌、膵臓癌、直腸癌、胃癌及び肺癌の治療を目的とする。本明細書で使用するこれらの（非共役）アントラサイクリン細胞毒性剤のあるものは、それ自体新規であり、非常に有効であるが、その毒性レベルが非結合形で使用するのには高すぎる。

本発明によるダウノサミン変性DOX類似体は、ペプチドキャリアと共有結合を形成するために好適な新規、高活性、非交叉耐性の、DOX類似体の研究の間に開発された。

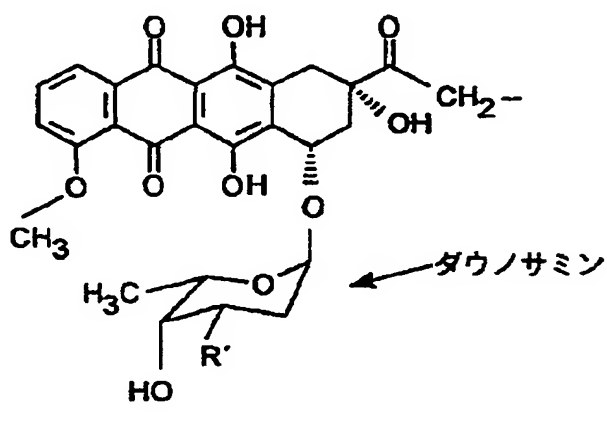
成分の生物学的活性が充分保持されている安定な共有結合体の形成は、グルタ

ル酸の様なジカルボン酸スペーサーを使用することによって達成された。スペーサーのカルボキシル基1個がDOX又はDM-DOXの14-OH基とのエステル結合1個を形成し、スペーサーの他のカルボキシル基がペプチドキャリアの選択された遊離アミノ基とのカルボキシアミド結合1個を形成する。

本発明の化合物は一般式



[式中、Qは、一般式

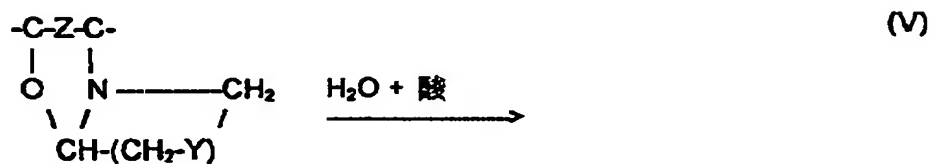
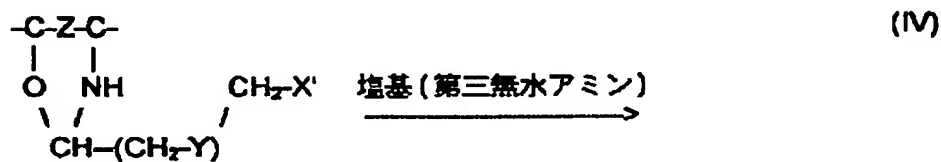
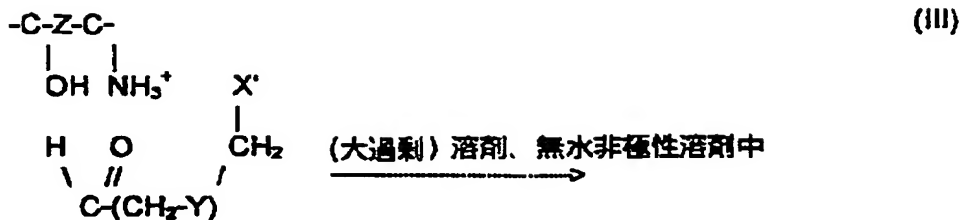


を表わし、 Q^{14} は14位に側鎖を有するQ基を表わし、 $R-$ はH又は $-C(O)-(CH_2)_n-$ であり、 $n=0\sim7$ であり、 R' は、 NH_2 又は芳香族飽和又は部分飽和の5員又は6員の複素環式化合物（これは環窒素少なくとも1個を有し、場合により前記環の隣接炭素原子と結合して双環系を形成するブタジエン基を有する）であり、 P は、H又はペプチド基、有利にはLHRH、ソマトスタチン又はボンベシン類似体であるが、その他の生理学的に活性のペプチドを除外するものではない]により表わされる。特に新生物細胞受容体に対する親和性を有するようなLHRH類似体、特に6位にD-Lys基を有するような類似体並びに短縮ソマトスタチン及びボンベシン類似体が好適である。 R' が NH_2 である場合には、 R 及び P はH以外のものである。 R 及び P がHである場合には、 R' は NH_2 以外のものである。

新規合成反応はこの研究の途中で発見された。ドキソルビシン及びその誘導体

が、14位でジカルボキシル基を介して結合して、薬理学的作用を有する新規共役結合体を生成することを見出しただけでなく、ビシナル又はディスジャンクトな即ち α , β -又は α , γ -ヒドロキシ第一アミンから部分的に飽和した複素環式基を形成する新規方法も得られた。本発明の詳細な出願は、ダウノサミン糖上の2"-ピロリニル及び1", 3"-テトラヒドロピリジニル基の形成である。しかし、この反応はより広い出願可能性を有する。5及び6員の部分的に飽和した複素環式基は、ビシナル又はディスジャンクトなヒドロキシアミンをアルデヒド炭素とハロゲン基を有する炭素原子との間に2又は3個の基を有するハロゲン-置換アルデヒドとを反応させる場合に、形成することができる。これらの基は全てメチレンであってもよいし、ヘテロ原子、例えば酸素が包含されていてもよい。この反応は3段階で行われる。非常に過剰のハロアルデヒドをヒドロキシアミンの酸塩と、有利には極性不活性無水有機溶剤中で反応させる。それによって、5員のオキサゾリジン環（又は6員の1, 3-テトラヒドロオキサジン環）がアルデヒド基をヒドロキシル及びアミン基と縮合させることによって形成される。この生成物を有機塩基、有利には第三アミンを用いて処理し、その際、ハロゲン化水素酸の成分が元のハロアルデヒドのハロ基とオ

キサゾリジン又は1, 3-テトラヒドロオキサジン環の第二アミノ基の間で除去され、5員又は6員環の添加により縮合環構造を形成する。次いで塩基を弱酸、有利には有機酸、例えば氷酢酸で中和する。水性酸、有利には有機酸で処理することによって、縮合環のオキサゾリジン又は1, 3-テトラヒドロオキサジン部が開裂する。出発アルデヒドに応じて、最終窒素を含有する環は前記したように少なくとも1個の付加的なヘテロ原子を含有してよいことは、当業者には理解される。一般的な反応は下記のように図示される：



式中、X' はハロゲン、有利には臭素又は沃素、有利には沃素であり、Y は C H₂、O C H₂、C H₂-C H₂であり、Z は単結合又は C H₂である。

Z が単結合である場合には、反応第 1 工程としてアルデヒド成分は 5 員のオキサゾリジン環を形成する。Z が C H₂である場合には、アルデヒド基は 6 員の 1, 3-テトラヒドロオキサジン環を形成する。このような環形成は公知であるが、例えば無水媒剤中の塩基性媒剤、例えば第三アミン中でのハロアルカン側鎖によって環を閉鎖させることと組み合わせるとは、この反応は新規であり、意外である。

図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明による化合物及び D O X の異なる用量レベルに関する、エス

トロゲン非依存性MXTマウス乳癌の容量変化のプロット図である。

第2図は、本発明による特定の化合物、先行技術の化合物、DOX及び対照の種々の用量レベルに関する、エストロゲン非依存性MXTマウス乳癌の容量変化のプロット図である。

第3図は、エストロゲン非依存性MXTマウス乳癌

のマウスの生存に対する細胞毒性LHRH類似体の作用のプロット図である。

第4図は、先行技術のアゴニスト及び本発明の特定の化合物を用いる治療の間の、ラットDunning R-3327-H前立腺癌移植片を有する雄のコペンハーゲンラットにおける腫瘍容量のプロット図である。

第5図は、Dunning R-3327-H前立腺癌のラットにおける腫瘍容量に対する本発明の特定の化合物及び相応する細胞毒性LH-RH類似体を用いる治療の効果を示すプロット図である。

第6図は、Dunning R-3327-H前立腺癌を有するコペンハーゲンラットの体重に対する、本発明の特定の化合物及び相応する細胞毒性LH-RH類似体を用いる治療の効果を示すプロット図である。

第7図は、本発明の特定の化合物及びDOXを用いる治療により達成された腫瘍増殖の抑制を示すプロット図である。

有利な態様の説明

基Qは、R'で特定の有利な基により置換されている場合には、Q₁～Q₈で表わされる亜基を有し、その中Q₂～Q₈は新規細胞毒性基である。

R'は、下記の括弧内に列記した有利なQ₁を生じる有利な値を有する：NH₂ (Q₁)、ピロリジン-1-イル (Q₂)、イソインドリン-2-イル (Q₃、

)、3-ピロリン-1-イル (Q₄)、3-ピロリドン-1-イル (Q₅)、2-ピロリン-1-イル (Q₆)、3-ピペリドン-1-イル (Q₇)又は1,3-テトラヒドロピリジン-1-イル (Q₈)。

従ってR-PがHであり、-R'が-NH₂である場合は、Q₁はDOXであり、R-PがHであり、-R'がピロリジン-1-イルである場合は、Q₂は3'

-デアミノ-3'- (ピロリジン-1"-イル) -ドキシソルビシン (Q₂) であり、R-PがHであり、-R'がイソインドリン-2-イルである場合は、Q₃は3'-デアミノ-3'- (イソインドリン-2"-イル) -ドキシソルビシン (Q₃) であり；R-PがHであり、-R'が3-ピロリン-1-イルである場合は、Q₄は3'-デアミノ-3'- (3"-ピロリン-1"-イル) -ドキシソルビシン (Q₄) であり；R-PがHであり、-R'が3-ピロリドン-1-イルである場合は、Q₅は3'-デアミノ-3'- (3"-ピロリドン-1"-イル) -ドキシソルビシン (Q₅) であり；R-PがHであり、-R'が2-ピロリン-1-イルである場合は、Q₆は3'-デアミノ-3'- (2"-ピロリン-1"-イル) -ドキシソルビシン (Q₆) であり；R-PがHであり、-R'が3-ピペリドン-1-イルである場合は、Q₇は3'-デアミノ-3'- (3"-ピペリドン-1"-イル) -ドキシソルビシン (Q₇) であり；R-PがHであり

、-R'が1, 3-テトラヒドロピリジン-1-イルである場合は、Q₈は3'-デアミノ-3'- (1", 3"-テトラヒドロピリジン-1"-イル) -ドキシソルビシン (Q₈) である。

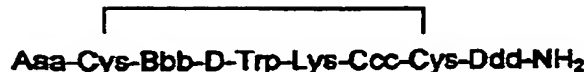
アルキル化作用を有する五員環中でダウノサミン窒素を組み込む化合物は、六員環中にダウノサミン窒素を組み込むその同族対照体よりも生体内で10~50倍活性が高い (この様な組み合わせは、Q₅及びQ₇並びにQ₆及びQ₈)。

本発明の有利な態様では、式Q¹⁴-O-R-Pの物質中で、R及びPは水素以外のものである。Pが水素以外のものである場合には、即ちP₁、P₂及びP₃であり、有利にはP₁がLH-RHアゴニストキャリア、LH-RH拮抗物質キャリア又は短縮LH-RH類似体キャリアである場合には、P₂は短縮ソマトスタチン類似体であり、P₃はボンベシン拮抗物質である。

有利には、P₁は、A a a - B b b - C c c - S e r - T y r - D - L y s (X x x) - L e u - A r g - P r o - D d d [式中、(X x x)は水素又はジアミノ置換分、例えばA₂Bu又はA₂Prであり、その際、A a aがGlpである場合には、B b bはHisであり、C c cはTrpであり、D d dはGly-NH₂であり、A a aがAc-D-Nal (2)、Ac-D-Phe又はAcD-

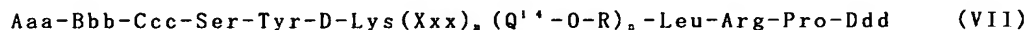
P h e (4 C l) である

場合には、B b b は D - P h e (4 C l) 又は D - P h e であり、C c c は D - P a l (3) 及び D - T r p であり、D d d は D - A l a - N H ₂ であり； A a a - B b b - C c c が A c である場合には、D d d は - N H - C H ₂ - C H ₃ である] であり； P ₂ は、



[式中、A a a が D - P h e である場合には、B b b は T y r であり、C c c は V a l であり、D d d は T h r 又は T r p であり； A a a が D - T r p である場合には、B b b は P h e であり、C c c 及び D d d は T h r である] であり、P ₂ は、A a a - G l n - T r p - A l a - V a l - G l y - H i s - L e u B b b - N H ₂ [式中、A a a は O、D - T p i 又は D - P h e であり、B b b は (C H ₂ - N H) L e u、(C H ₂ - N H) P h e、(C H ₂ - N H) T r p、(C H ₂ - N) T a c 又は (C H ₂ - N) D M T a c である] である。

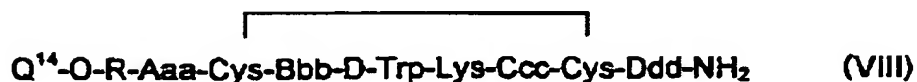
L H - R H 類似体を組み込む本発明の新規化合物中では、細胞毒性基 Q は、式 VII



[式中、m は 1 又は 0 であり、m が 1 の場合には n は 1 又は 2 である、即ち (X x x) は A ₂ B u 又は A ₂

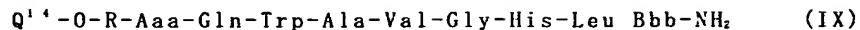
P r であり、m が 0 の場合には n は 1 又は 2 である、即ち (X x x) は H であり、n は 1 である] で表わされるように、ジカルボキシン酸スペーサーを介して、L H - R H 類似体上の D - L y s 側鎖又はそれに結合した (X x x) 基に結合している。

ソマトスタチン類似体を組み込む本発明の新規化合物中では、細胞毒性基 Q は、式 VIII



）で表わされるように、ジカルボキシン酸スペーサーを介して、ソマトスタチン類似体のアミノ末端に結合している。

ポンペシン拮抗物質類似体を組み込む本発明の新規化合物中では、細胞毒性基 Q は、式 IX

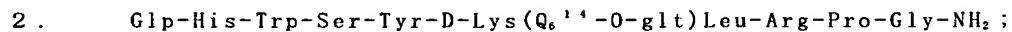
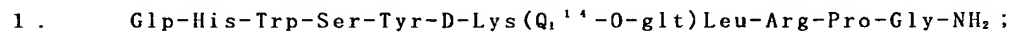


で表わされるように、ポンペシン拮抗物質のアミノ末端に結合している。

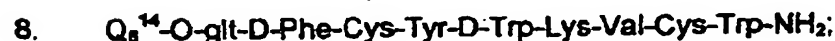
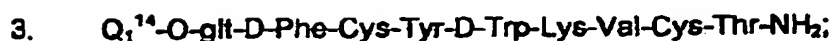
本発明の特に有利な態様は、細胞毒性基としての Q_1 及び Q_6 及び Q_1 (ドキソルビシン) 又は Q_6 (2-ピロリノードキソルビシン) と 14-O-エステル結合及びペプチドキャリアとカルボキサミド結合を形成するジカルボン酸スペーサーとしてのグルタル酸 (

$n=3$) を含有する様なペプチド結合体である。

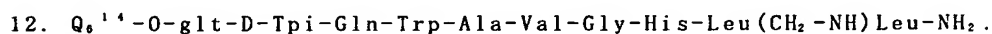
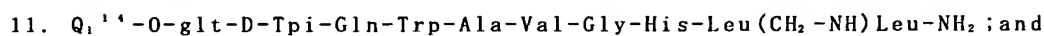
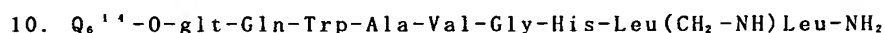
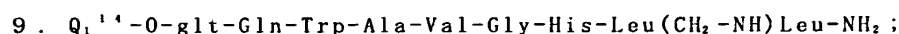
本発明の最も有利な態様は、下記式：



の細胞毒性 LH-RH 類似体、下記式：



の細胞毒性ソマトスタチン類似体及び下記式：



の細胞毒性ボンベシン拮抗物質類似体である。

ピシナル又はディスジャンクトの、即ち α 、 β —又は α 、 γ —ヒドロキシアミンの窒素と部分的に飽和した複素環式環を形成する新規方法において、反応の第1工程は、無水の不活性有機極性、ノン—ヒドロキシル（中性）溶剤中で行い、有利にはジメチルホルムアミド中で、実質的に過剰の、有利には30倍過剰のハロアルデヒド、4—ヨードブチルアルデヒド及び5—ヨードパレルアルデヒドを使用するのが特に有利である。しかし、本発明はこれらに限定されるものではなく、沃素の代わりに臭素を使用してもよい。この反応及び引続く工程は室温で行

うことができる。

塩基処理は、過剰の、有利には2～4倍過剰の有機塩基を用いて実施する。第三アミン、例えばトリアルキルアミンがこの目的に好適である。

こうして形成した双環を、水の存在で有機酸で処理することによって開環させて、ビシナル又はディスジャンクトなヒドロキシル基を放出させる。希水性トリフルオル酢酸を、有利には不活性有機溶剤、例えばアセトニトリル中で、使用することができる。揮発物を減圧下で除去し、過剰のハロゲン化合物をヘキサンで抽出し、残分をHPLCで精製することによって、生成物を精製する。

略語

本発明のペプチド及びその誘導体の記載で、一般にペプチド化学業界で受け入れられており、IUPAC

— I U B C o m m i s s i o n o n B i o c h e m i c a l N o m e n c l a t u r e [E u r o p e a n J . B i o c h e m . , 1 3 8 , 9 ~ 3 7 頁 (1 9 8 4 年)] により推奨されているように、アミノ酸に慣用の略語を用いる。

個々のアミノ酸残基の略語は、アミノ酸の慣用名に基づく、例えば、G l p はピログルタミン酸、H i s はヒスチジン、T r p はトリプトファン等である。略語は、他に記載のない限り、アミノ酸のL異性体形を示す、例えばS e r はL—セリンであり、D — L y s はD—リジンである。

本発明における一般的ではないアミノ酸の略語は下記のものである：D — N a l (2) はD — 3 — (2 — ナフチル) アラニンであり、D — P a l (3) はD — 3 — (3 — ピリジル) アラニンであり、D — P h e (4 C l) はD — 4 — クロルフエニルアラニンである。

ペプチド配列は、慣用に従って記載し、その際、N—末端アミノ酸は左に、C—末端アミノ酸は右にある、例えばG l p — H i s — T r p。

式、L e u (C H ₂ — N H) L e u — N H ₂ はペプチド配列のC末端でロイシン及びロイシンアミド基の間の短縮ペプチド結合を表わす。

使用したその他の略語は下記とおりである：

A₂B u : ジアミノ酪酸

A₂P_r : ジアミノプロピオン酸

B_N : ボンベシン

BOP試薬 : ペンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート

DIPEA : N, N-ジイソプロピルエチルアミン

DM-DOX : ダウノサミン変性ドキシソルビシン

DMF : N, N-ジメチルホルムアミド

DMT_{ac} : 5, 5-ジメチル-1, 2, 4-トリアゾリジン-4-カルボン酸

DOX : ドキシソルビシン

Fmoc : 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル gl_t : $-C(O)-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-$ 、グルタリル

Gl_t_2O : 無水グルタル酸

HOB_t : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

HO- gl_t -OH : グルタル酸

HOSu : N-ヒドロキシスクシンイミド

HPLC : 高速液体クロマトグラフィー

TFA : トリフルオール酢酸

T_{ac} : チアゾリジン-4-カルボン酸

T_{pi} : 2, 3, 4, 9-テトラヒドロ-1H-ピリド[3, 4-b]インドール-3-カルボン酸。

168型ダイオードアレイ検出器及びシステム ゴールド クロマトグラフィ
ソフトウェア (System Gold chromatography

software) (Beckman) を具備したベックマン分析HPLCシステムを用いて、化学反応をモニターし、本発明の化合物の純度を検査した。使用したカラムはDynamax C-18 (250×4.6 mm; 孔の大きさ: 300 Å; 粒度: 12 μm) であった。化学反応をモニターするために、(i) 水中の0.1% TFA及び(ii) 70%水性アセトニトリル中の0.1% TFA

の2種類の成分から成る溶剤系を1分間に1% (i i) 増加する直線傾斜法で使用了。系は純粹な対照に關してアイソクラチックモードで使用了。

ベックマンモデル342半調製HPLC系を使用して、本發明の化合物の単離及び精製を行った。カラムはアクアポール オクチル (A q u a p o r e O c t y l) (250 × 10 mm ; 孔の大きさ : 300 Å ; 粒度 : 15 μ m) であつた。溶剤系は前記分析HPLC用に記載したものと同一であつた。

分析

B r u k e r A R X 300 NMR分光計 (300 MHz 1H周波数、75 MHz 13C周波数) 及びエレクトロスプレー 質量分光計 F i n n i g a n - M A T T S Q 7000 を使用して、ドキシソルピシン誘導体の構造を同定した。

ペプチドキャリアの合成

本發明のペプチドは製藥的に認容性の無毒の塩、例

えば酸付加塩の形で投与されることが多い。このような酸付加塩の例は、塩化水素塩、臭化水素塩、硫酸塩、磷酸塩、フマル酸塩、グリコン酸塩、タンニン酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、トリフルオル酢酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、琥珀酸塩、アルギン酸塩、パモエート、マレイン酸塩、アスコルビン酸塩、酒石酸塩等である。活性成分を錠剤形で投与する場合には、錠剤は、結合剤、例えばトラガント、コーンスターチ又はゼラチン、崩壊剤、例えばアルギン酸及び潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウムを含む製藥的に認容性の希釈剤を含有することができる。

液体形の投与が望ましい場合には、甘味及び／又は芳香剤を製藥的に認容性の希釈剤の一部として使用することができ、等張食塩水、緩衝剤溶液等中の静脈内投与が有効である。

薬剤組成物は、一般にペプチドを、慣用の製藥的に認容性のキャリアと結合させて含有する。一般に用量は、静脈内投与の場合には宿主の体重1kg当たりペプチド1～約100マイクログラムであり、経口用量はこれよりはるかに高いであろう。全般的にこれらのペプチドを用いる患者の治療は一般にその他のLHRH

類似体、ソマトスタチン及びドキシソルピシン類似体を用いる臨床治療と同じように行われる。

これらのペプチドは哺乳類に静脈内、皮下、筋肉内、経口、鼻内又は膣内に投与して、特異的な受容体と

結合することによって生物学的ホルモン効果を達成させることができる。LHRH類似体の場合には、これらの効果には生殖腺活性の可逆的な抑制が含まれ、ソマトスタチン類似体の場合には、胃腸機能の抑制が含まれる。有効用量は、投与形及び治療すべき哺乳類の詳細な種類により変わる。代表的な用量形の例は、体重1kg当たり約0.1～2.5mgの範囲の用量が投与されることになる溶液である、ペプチドを含有する生理的食塩水溶液である。ペプチドの経口投与は固体形で投与してもよいし、液体形で投与してもよい。

本発明のペプチドキャリアの合成は、ペプチド化学業界の当業者に公知の任意の方法で実施することができる。好適な方法のまとめがM. ボーデンスキー (Bodanszky) 著、Principles of peptide Synthesis (Springer-Verlag、ハイデルベルク、1984年) に記載されている。固体相ペプチド合成法は、J. M. スチュワート (Stewart) 及びJ. D. ヤング (Young) 著、Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chem. Co.、イリノイ州ロックフォード、1984年、第2版) の教科書及びG. バラニー (Barany) その他著、Int. J. Peptide and Protein Res. 第30巻、705～739頁 (1987年) の概観に記載されている。

本発明で使用されるLH-RH類似体キャリアの合成は、米国特許第5258492号明細書の (Sandor Bajusz 及びAndrew V. Schally、1993年11月2日) の実施例及びバジャツ (Bajusz) その他著、Proc. Natl. Acad. Sci. USA第85巻、1637～1641頁 (1988年) 及び第86巻、6318～6322頁 (1989年) 及びジャナキー (Janaky) その他著、Proc. Natl. Acad. Sc

i. U S A、第89巻、1023～1027頁及び972～976頁（1992年）の論文に詳説されている。

本発明で使用するソマトスタチン類似体キャリアの合成は、米国特許第4650787号明細書（1987年3月17日、Andrew V. Schally及びRenz Z. Cai.）の実施例に詳説されている。合成の説明は、カイ（Cai）その他著、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A第83巻、1896～1900頁（1986年）及びProc. Natl. Acad. Sci. U S A第84巻、2502～2506頁（1987年）にも記載されている。

本発明で使用するボンベシン拮抗物質キャリアの合成は、コイ（Coy）その他著、J. Biol. Chem. 第263巻、5056～5060頁（1988年及び第264巻、14691～14697頁（1989年）及びカイその他著Peptides第13巻、267～271頁（1992年）及びProc. Natl. Acad. Sci. U S A第91巻、12664～12668頁（1994年）の論文に詳説されている。

次に実施例に付き、本発明に使用されるドキソルビシン誘導体の合成及び別のペプチドキャリアとの共役結合体の生成を詳説するが、本発明はこれにのみ限定されるものではない。

例 1

N-Fmoc-DOX¹⁴-O-ヘミグルタレート¹⁴の製造及び単離

DOX HCl塩、50mg（86μモル）をDMF 1ml中に溶解させ、Fmoc-OSu 30mg（90μモル）を加え、次いでDIPEA 31μl（180μモル）を加えた。3時間攪拌した後、分析HPLCにより評価したように、反応は完了した。溶剤をSpeed Vac高真空蒸発器中で蒸発乾固させ、残分をH₂O中の0.1% TFAで摩擦することによって晶出させた。結晶を濾過し、冷エーテルで1回洗浄して痕跡の過剰Fmoc-OSuを除去した。デシケータ中で乾燥させた後、98%純粋なN-Fmoc-DOX、m=62mgが得られた。収率：94%。

中間生成物を $\text{Gl t}_2\text{O}$ 1.1. 4 mg (100 $\mu\text{モ}$

ル) と無水DMF 1 ml 中でD I P E A 26. 1 μl (150 $\mu\text{モル}$) の存在で1晩反応させた。溶剤をS p e e d V a c 中で蒸発させ、残留油状物を0. 1%水性T F A (v/v) で摩擦することによって固体にした。こうして得た粗生成物は、分析H P L Cにより評価されるように、N-F m o c-D O X 14-O-ヘミグルタレート70%、未反応N-F m o c-D O X 20%及びその他の不純物10%を含有する。この粗生成物を更に精製せずにペプチドD O X 共役結合体の製造に使用することができる。この粗生成物をT F A 0. 1%を含有する60%水性アセトニトリル20 ml 中に溶解させ、半調製H P L Cにかけると、98%純粋なN-F m o c-D O X 14-O-ヘミグルタレート最終生成物45. 7 mg が得られた(収率: 64%)。

例 2

3'-デアミノ-3'-(ピロリジン-1"-イル)-ドデキソルピシンT F A 塩(Q_2)及びその14-O-ヘミグルタレート(A N-193)T F A 塩の製造及び単離

D O X H C l 塩50 mg (86 $\mu\text{モル}$) をDMF 1 ml 中に溶解させ、15倍過剰の1, 4-ジヨードブタン171 μl (1. 3ミリモル) を加え、次いで3倍過剰のD I P E A 45 μL (260 $\mu\text{モル}$) を加えた。反応混合物を室温で1晩攪拌した。16時間後

、分析H P L Cにより評価したように、反応は完了した。溶剤をS p e e d V a c で蒸発させ、残留した油状物を H_2O 中の0. 1%T F A 3 ml 中に溶解させ、エーテルで抽出して、過剰の1, 4-ジヨードブタンを除去する。次いで水性抽出物をH P L Cにかけ、98%純粋なD O X 誘導体m: 41. 6 mg が得られた(収率68%)。

こうして得た3'-デアミノ-3'-(ピロリジン-1"-イル)-ドデキソルピシンT F A 塩(Q_2)41. 6 mg (58 $\mu\text{モル}$) を $\text{Gl t}_2\text{O}$ 1. 2当量と無水DMF 中で正確に例1に記載したようにして反応させた。収率は35%(16

・ 9 m g) であり、純度は 9 8 % であった。

例 3

3' - デアミノ - 3' - (イソインドリン - 2" - イル) ドデキソルピシン T F A 塩 (Q₃) の製造及び単離

D O X H C l 塩 5 0 m g (8 6 μ モル) を D M F 1 m l 中に溶解させ、 1 5 倍過剰の α , α' - ジクロロ - オルト - キシレン 2 2 6 m g (1 . 3 ミリモル) を加え、次いで 3 倍過剰の D I P E A 4 5 μ l (2 6 0 μ モル) 及び触媒量の N a I を加えた。 1 6 時間後、溶剤を S p e e d V a c で除去し、残分を 0 . 1 % 水性 T F A 3 m l 中に溶解させ、エーテル 3 m l で抽出して、過剰のハロゲン化合物を除去した。こう

して得た粗生成物を H P L C にかけた。精製後、 9 8 % 純粋な最終生成物 3 6 m g が得られた (収率 : 5 5 %) 。

例 4

3' - デアミノ - 3' - (3" - ピロリン - 1" - イル) - ドデキソルピシン T F A 塩 (Q₄) の製造及び単離

D O X H C l 塩 5 0 m g (8 6 μ モル) を D M F 1 m l 中に溶解させ、 1 5 倍過剰のシス - 1 , 4 - ジクロロ - 2 - ブテン (A l d r i c h) 1 3 6 . 8 μ l (1 . 3 ミリモル) を加え、次いで 3 倍過剰の D I P E A 4 5 μ l (2 6 0 μ モル) を加えた。 1 6 時間後、溶剤を S p e e d V a c で除去し、残分を 0 . 1 % 水性 T F A 3 m l 中に溶解させ、ヘキサン 3 m l で抽出して、過剰のハロゲン化合物を除去した。こうして得た粗生成物を H P L C にかけた。精製後、 9 8 % 純粋な最終生成物 2 2 . 6 m g が得られた (収率 : 3 7 %) 。

例 5

1 - クロロ - 4 - ブロム - 2 - ブタノン (C₄H₉ClBrO) 及び 1 - クロロ - 5 - ブロム - 2 - ペンタノン (C₅H₉ClBrO) の製造及び単離

塩化 3 - ブロムプロピオニル 1 0 0 . 8 μ l (1 ミリモル) (A l d r i c h) をエーテル中の過剰のジアゾメタンと反応させた。 1 時間後エーテル性溶液を

溶離させ、スポットをTLCで試験した。Merck Art No. 5554
 によるシリカゲル60 F254で下塗りしたで薄層クロマトグラフィーアルミ
 ニウムシートを固定相として使用し、CHCl₃:MeOH95:5 (v/v)
 を移動相として使用した。スポット試験用に2,4-ジニトロフェニルヒドラジ
 ン試薬 (Vogel: A text book of Practical Organic Chemistry) 1061頁、第3版、Longmans、ニ
 ューヨーク) を溶離後にTLCシートに噴霧した。こうして生成したジアゾメチ
 ルケトン誘導体はR_f: 0.3の黄色のスポットを示した。次いでエーテル性溶
 液をエーテル中の無水HClと反応させて、ジアゾメチルケトン、所望の最終
 生成物である1-クロル-4-ブロム-2-ブタノンに変えた。この生成物は、
 前記したものと同一溶剤系中で及びスポット試験試薬を用いて、R_f: 0.8の
 、オキソ化合物の特徴である黄色のスポットを示した。溶剤蒸発後、粗生成物を
 、シリカゲル15gを充填したカラム (長さ15cm、直径2.5cm) (Me
 rck、等級9385、230~400メッシュ、孔の大きさ60Å) に入れた。
 液体移動相は純粋なCHCl₃であった。所望の最終生成物 (前記スポット試験
 により確認) を含有するフラクションを混合し、蒸発乾固させた。M=1.5g
 、透明な油状物が得られた。収率: 80%。

1-クロル-5-ブロム-2-ペンタノンは、塩化4-ブロムブチルから1-
 クロル-4-ブロム-2-ペンタノンに関する記載と同じ方法であるが、塩化3-
 ブロムプロピオニルに代わりに塩化4-ブロムブチリルを用いて製造した。収
 率: 80%。

例 6

3'-デアミノ-3'-(3"-ピロリドン-1"-イル) ドキソルピシンTFA
 塩 (Q₅) の製造及び単離

DOX HCl 塩 50mg (86μmol) をDMF 1ml中に溶解させ、15
 倍過剰の1-クロル-4-ブロム-2-ブタノン 241mg (1.3ミリモル)
 を加え、次いで3倍過剰のDIP EA 45μl (260μmol) を加えた。16
 時間後、溶剤をSpeed Vacで除去し、残分を0.1%水性TFA 3ml

中に溶解させ、ヘキサン 3 ml で抽出して、過剰のハロゲン化合物を除去した。
こうして得た粗生成物を HPLC にかけた。精製後、98% 純粋な最終生成物 2
0.6 mg が得られた (収率: 33%)。

例 7

3'-デアミノ-3'-(3"-ピペリドン-1"-イル)ドキシソルピシン TFA
A 塩 (Q7) の製造及び単離

DOX HCl 塩 50 mg (86 μ mol) を DMF 1 ml 中に溶解させ、15
倍過剰の 1-クロル-5-

ブロム-2-ペンタノン 260 mg (1.3 ミリモル) を加え、次いで 3 倍過剰
の DIPEA 45 μ l (260 μ mol) を加えた。16 時間後、溶剤を Speed
Vac で除去し、残分を 0.1% 水性 TFA 3 ml 中に溶解させ、ヘキサン
3 ml で抽出して、過剰のハロゲン化合物を除去した。こうして得た粗生成物を
HPLC にかけた。精製後、95% 純粋な最終生成物 18 mg が得られた (収率
: 28%)。

例 8

4-ヨードブチルアルデヒド及び 5-ヨードバレルアルデヒドの精製及び単離

2-(3-クロルプロピル)-1,3-ジオキソラン (4-クロル-n-ブチ
ルアルデヒドエチレンアセタール) 1.3 ml (10 ミリモル) (Fluka)
を NaI 30 g (200 ミリモル、20 倍過剰) を含有するアセトン 200 ml
中に溶解させた。溶液を 24 時間還流させ、次いで蒸発乾固させた。エーテル 1
00 ml を使用して、有機物質を無機固体残分から抽出した。次いでエーテル性
溶液を H₂O 50 ml、5% 水性 Na₂S₂O₃ 50 ml 溶液で洗浄し、H₂O 50
ml で 3 回洗浄した。エーテルを真空中で除去し、残留した油状物を 50% 水性
酢酸 3 ml 中に溶解させた。1 時間後、エーテル 100 ml をこの溶液に加え、
酢酸並びにエチレングリコールを H₂O 50 ml で 3 回洗浄することによって除
去した。主生成物を、

純 CHCl₃ 中で TLC で R_f: 0.8 で溶離させた。アルデヒドファンクショ

ンのために使用されるスポット試験は例5でケトン用に記載したものと同一であった。次いでエーテルを除去し、黒色油状物をシリカゲル15gを充填したカラム（長さ15cm）直径2.5cm（Merk）等級9385、230～400メッシュ、孔の大きさ60Å）に入れた。液体移動相はCHCl₃であった。所望の最終生成物（前記スポット試験により確認）を含有するフアクションを混合し、蒸発乾固させた。黄色油状物1.6gが得られた。収率：80%。

5-ヨードバレルアルデヒドが、同様にして、2-(4-クロルブチル)-1,3-ジオキサラン（5-クロル-n-バレルアルデヒド エチレン アセタール）（Fluka）から出発して得られた。黄色油状物1.65gが得られた。収率：80%。

例9

3'-デアミノ-3'-(2"-ピロリドン-1"-イル)ドキシソルピシンTFA塩（Q₈）の製造及び単離

DOX HCl塩50mg（86μモル）をDMF 1ml中に溶解させ、30倍過剰の4-ヨードブチルアルデヒド515mg（2.6ミリモル）を加え、次いでDIP EA 45μl（260μモル、3倍過剰）を加えた。1時間後、氷酢酸100μlを反応混合物

に加え、次いでこれを70%水性アセトニトリル中の0.1%TFA 5mlに滴加した（HPLC系の溶剤ii）。この溶液を0.1%TFA溶液2mlで希釈し、次いでアセトニトリルをSpeed Vac中で除去した。残留した溶液をヘキサンで抽出して、過剰のハロゲン化合物を除去した。こうして得た生成物をHPLCにかけた。精製後、98%純粋な最終生成物52mgが得られた（収率：85%）。

例10

3'-デアミノ-3'-(1", 3"-テトラヒドロピリジン-1"-イル)ドキシソルピシンTFA塩（Q₈）の製造及び単離

DOX HCl塩50mg（86μモル）をDMF 1ml中に溶解させ、30倍過剰の5-ヨードバレルアルデヒド552mg（2.6ミリモル）を加え、次

いで3倍過剰のD I P E A 45 μ l (260 μ モル) を加えた1時間後、氷酢酸100 μ l を反応混合物に加え、次いでこれを70%水性アセトニトリル中の0.1% T F A 5 m l に滴加した(H P L C 系の溶剤 i i)。この溶液を0.1% T F A 水溶液2 m l で希釈し、次いでアセトミトリルをS p e e d V a c 中で除去した。残留した溶液をヘキサンで抽出して、過剰のハロゲン化合物を除去した。こうして得た生成物をH P L C にかけた。精製後、98%純粋な最終生成物46 m g が得られた(収率: 75%)。

例 1 1

D O X を含有する細胞毒性L H - R H 作用物質類似体の精製及び単離

([D - L y s ⁶ (D O X ^{1'} - O - g l t)] L H - R H、Q ₁ ^{1'} g L)

[D - L y s ⁶] L H - R H 60 m g (37.5 μ モル) 及びN - F m o c - D O X 14 - O - ヘミグルタレート(例1参照) 52 m g (64%純粋、37.5 μ モル) をD M F 1 m l 中に溶解させ、B O P 試薬(A l d r i c h) 22 m g (50 μ モル)、H O B t 13.5 m g (100 μ モル) 並びにD I P E A 52 μ l (300 μ モル) を加えた。1時間室温で攪拌した後、反応は完了する。溶剤を蒸発させ、残留した油状物を酢酸エチル3 m l で晶出させ、次いで酢酸エチル3 m l で2回洗浄した。次いで粗固体物質をD M F 3 m l 中に溶解させ、ピペリジン300 μ l を加えた。5分後、反応を氷浴中へ入れ、T F A 300 μ l、ピペリジン700 μ l 及びD M F 2 m l の混合物を添加することによって酸性にした。溶剤を蒸発させた後、残留した油状物を酢酸エチルで固体にする。こうして得た粗固体をT F A 0.1%を含有する70%水性アセトニトリル1 m l 中に溶解させ(i)、0.1%水性T F A 3 m l で希釈し(i i)、半調製H P L C にかけた。98%純粋な最終生成物40 m g (14.8 μ モル) が得られた。収率: 48%。

例 1 2

2 - ピロリノ - D O X を含有する細胞毒性L H - R H 作用物質類似体の精製

[D - L y s ⁶ (2 - ピロリノ - D O X ^{1'} - O - g l t)] L H - R H、Q ₆ ^{1'} g

L)

Q₁¹⁴gL 11.2 mg (5 μmol) (例1参照)をDMF 200 μl中に溶解させ、4-ヨードブチルアルデヒド(例8) 30 mg (150 μmol、30倍過剰)を加え、次いでDIPEA 3 μl (17 μmol)を加えた。1時間後、反応は完了し(例9参照)、氷酢酸10 μlをこの反応混合物に加え、これを次いで70%水性アセトニトリル中の0.1% TFA 1 mlに滴加した。この溶液を次いで0.1%水性TFAで希釈し、アセトニトリルを真空中で除去した。次いで残留した水溶液をヘキサン1 mlで抽出し、HPLCにかけた。m: 7.6 mg、99%純粋な最終生成物が得られた。(収率: 66%)。

例13

DOXを含有する細胞毒性ソマトスタチン類似体の精製及び単離



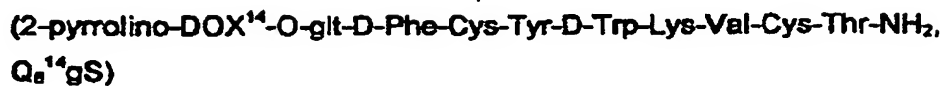
D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys(Fmoc)-Val-Cys-Thr-NH₂ 20

mg (14.5 μmol) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1986、1986~1990頁)及びN-Fmoc-DOX 14-O-ヘミグルタレート(例1参照) 20 mg (64%純粋、14.5 μmol)をDMF 200 μl中に溶解させ、BOP試薬(Aldrich) 8.8 mg (20 μmol)、HOBt 5.4 mg (40 μmol)並びにDIPEA 17 μl (100 μmol)を加えた。1時間室温で攪拌した後、反応は完了した。溶剤を真空中で蒸発させた後、残分を酢酸エチルで結晶化させた。次いで固体物質をDMF 1 ml中に溶解させ、ピペリジン100 μlを加えた。7分後に、反応を氷浴中へ入れ、TFA 100 μl、ピペリジン300 μl及びDMF 2 mlの混合物を添加することによって酸性にした。溶剤を蒸発させた後、残留した油状物を酢酸エチルで固体にする。こうして得た粗固体をTFA 0.1%を含有する70%水性アセトニトリル1 ml中に溶解させ(i)、0.1%水性TFA 3 mlで希釈し(ii)、半調製HPLCにかけた。95%純粋な最終生成物 9.7 mg (5.1 μmol)

が得られた。収率：35%。

例 1 4

2-ピロリノーDOXを含有する細胞毒性ソマトスタチン類似体の精製



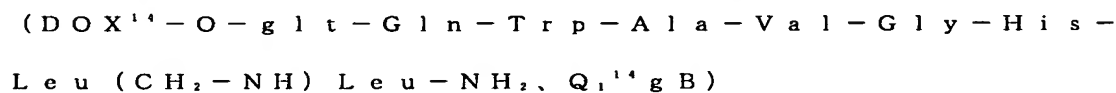
4 mg、5 μ モル) をDMF 100 μ l中に溶解させ、2-ピロリノーDOX¹⁴-O-ヘミグルタレート(4.1 mg、5 μ モル)を加え、次いでBOP試薬(4.4 mg、10 μ モル)、HOBt(100 μ モル)及びDIPEA(50 μ モル)を加えた。2時間室温で撹拌した後、反応混合物をAcOH 20 μ lにより酸性にし、TFA 0.1%を含有する70%水性アセトニトリル500 μ lで希釈し、更に0.1%水性TFA 700 μ lで希釈し、HPLCにかけた。99%純粋な最終生成物3.9 mg(収率：40%)が得られた。

例9に記載した様にして、DOX¹⁴-O-ヘミグルタレートを4-ヨードブチルアルデヒドと反応させることによって2-ピロリノーDOX¹⁴-O-ヘミグルタレートを製造した。

N-Fmoc-DOX¹⁴-O-ヘミグルタレートから、例11に記載したようにしてFmoc保護基を劈開することによってDOX¹⁴-O-ヘミグルタレートを製造した。

例 1 5

DOXを含有する細胞毒性ポンペシン拮抗物質の精製及び単離



Leu-NH₂ 20 mg (15.8 μmol) (Int. J. Peptide Protein Res. 38, 1991, 539~600頁) 及び N-Fmoc-Dox14-O-ヘミグルタレート (例1) 22 mg (64% 純粋、15.8 μmol) を DMF 200 μl 中に溶解させ、BOP 試薬 (Aldrich) 8.8 mg (20 μmol)、HOBt 5.4 mg (40 μmol) 並びに DIPEA 17 μl (100 μmol) を加えた。1時間室温で攪拌した後、反応は完了した。溶剤を真空中で蒸発させ、残分を酢酸エチル 3 ml で結晶化させた。次いで固体物質を DMF 1 ml 中に溶解させ、ピペリジン 100 μl を加えた。5分後、反応を氷浴中へ入れ、TFA 100 μl、ピペリジン 300 μl 及び DMF 2 ml の混合物を添加することによって酸性にした。溶剤を蒸発させた後、残留した油状物を酢酸エチルで固体にした。こうして得た粗固体を TFA 0.1% を含有する 70% 水性アセトニトリル 1 ml 中に溶解させ (i)、0.1% 水性 TFA 3 ml で希釈し (ii)

、半調製 HPLC にかけた。98% 純粋な最終生成物 13.5 mg (7.1 μmol) が得られた。収率: 45%。

例 16

2-ピロリノーDOX を含有する細胞毒性ポンペシン拮抗物質類似体の精製及び単離

2-ピロリノーDOX¹⁴-O-gl t-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH₂-NH) Leu-NH₂、Q₁₄gB

Q₁₄gB 9.5 mg (5 μmol) (例15) を DMF 200 μl 中に溶解させ、4-ヨードブチルアルデヒド (例8) 30 mg (150 μmol、30倍過剰) を加え、次いで DIPEA 3 μl (17 μmol) を加えた。1時間後、反応は完了し (例9参照)、氷酢酸 10 μl をこの反応混合物に加え、これを次いで 70% 水性アセトニトリル中の 0.1% TFA 1 ml に滴加した。この溶液を次いで 0.1% 水性 TFA で希釈し、アセトニトリルを真空中で除去した。次いで残留した水溶液をヘキサン 1 ml で抽出し、HPLC にかけた。98% 純粋な最終生成物 6 mg が得られた。(収率: 60%)。

試験管内における細胞毒性の測定

MXTEストロゲン-非依存性マウス乳癌セルラインは、Dr. Gunter Berndhart, University of Regensburg (ドイツ) から入手した。本発明の化合物の抗増殖活性を測定するために使用したその他のセルラインは全てAmerican Type Culture Collection (ATCC) から入手した。

類似体の活性を評価するために、マイクロ滴定プレートの比色細胞毒性分析をクリスタルバイオレットで細胞を染色することによる生物量の定量を基礎にして使用したが、これは細胞数の測定と非常に良好な相関関係を示す。(Reile その他; Anal. Biochem. 187、262~267頁、1990; Bernhardt G. その他、J. Cancer Res. Clin. Oncol. (1992)、118、35~43; Spruss Th. その他、J. Cancer Res. Clin. Oncol. 117、435~443、1991; Gillies, R. J. Anal. Biochem. 159、109~113、1986; Kueng, W. その他; Anal. Biochem.、182 16~19、1989)。

分析計画案

96-ウエルプレート中で細胞を播種してから1~2日後に、培地を試験すべき化合物を含有する新しい培地及び対照培養用だけの新しい培地と交換した。種々の培養時間後に、細胞をグルタリクジアルデヒドで固定し、胎児の牛血清 (FBS) 下で4℃で実験終

了まで保存した。細胞をクリスタルバイオレットで染色し、結合した染色を70%水性EtOHで抽出した。最適密度をEIA Reader (Bio-Tek Instruments) 又はBiomek 1000 (Beckman) を用いて各々590nm又は600nmで測定する。各データ点は8つの培養ウエルの平均値を表わす。T/C値を $T/C = (T - CO) / (C - CO)$ として算出するが、その際、T=処理した培養の光学濃度、C=対照(未処理)培養の光学濃

度、 CO =培養開始時 ($t=0$) の培地の光学濃度である。

例 17

DOX のダウノサミン変性誘導体の試験管内細胞毒性活性

第 17-1 表は、ドキソルビシン及びそのダウノサミン変性誘導体の、試験管内における $MCF-7$ ヒト乳癌セルラインに対する効果を表わす。

反応性基を有する 5 員環中へ組み込まれたダウノサミン N を有する細胞毒性基は、3-ピロリドン- DOX (Q_5) 及び 3-ピペリドン- DOX (Q_7) 並びに 2-ピロリノ- DOX (Q_8) 及び 1, 3-テトラヒドロ-ピリジノ- DOX (Q_9) の例として、6 員環を有するその同族対照物よりも 5 ~ 50 倍高い活性を有する。第 17-1 表：ドキソルビシン及びそのダウノサミン変性誘導体の、試験管内における $MCF-7$

7 ヒト乳癌セルラインに対する効果

化合物	培養時間 (時間)	(M) における T/C 値					
		3×10^{-10}	10^{-9}	3×10^{-8}	10^{-7}	3×10^{-6}	10^{-5}
ドキソルビシン (DOX)	70				98	82	54
	120				95	66	33
ピロリジノ- DOX (Q ₂)	70				97	25	-26
	120				94	17	-19
ピベリジノ- DOX (AN-183)	70			114	70	4	
	120			109	67	0	
イソインドリノ- DOX (Q ₃)	70				118	86	-11
	120				108	77	-29
3-ピロリノ- DOX (Q ₄)	70			106	72	-3	
	120			97	65	-5	
3-ピロリド- DOX (Q ₅)	70			87	30	-28	
	120			67	25	-10	
3-ピベリドノ- DOX (Q ₇)	70			96	80	59	
	120			97	70	43	
2-ピロリノ- DOX (Q ₆)	70	50	-3	-18			
	120	26	2	-9			
1,3-テトラヒドロ ピリジノ- DOX (Q ₈)	70	96	88	69			
	120	99	93	62			

細胞は、96 ウェルプレート上の 5% HI-DCC-FBS (熱不活性化した、デキストラン塗布した木炭処理胎児牛血清) を含有する MEM 媒体中で培養した。処理及び対照プレート中の相対細胞数を、クリスタルバイオレット染色法で測定し、T/C 値として表わしたが、その際、 $T/C = (T - C_0) / (C - C_0)$

$\times 100$ [T=処理培養の吸着、C=対照培養の吸着、C₀=培養開始時 (t=0) の培養の吸着。測定した吸着は細胞数に比例する]。

低い T/C 値は、処理による癌細胞の生存の減少を示唆する。即ち、75 は対照の 100% と比較して細胞の 75% 生存又は 25% 抑制を示す。

例 18

LH-RH拮抗ペプチド共役結合体 Q_1 '⁴gL中のDOX及びLH-RH拮抗ペプチド共役結合体 Q_2 '⁴gL中の超活性2-ピロリノ-DOX (Q_2)の試験管内細胞毒性活性の完全な保持。

第18-1表は、試験管内におけるMCF-7ヒト乳癌セルライン及びMXTエストロゲン非依存性マウス乳癌セルラインの増殖に対する、ドキソルビシン及びそのダウノサミン変性誘導体、2-ピロリノドキソルビシン (Q_2)の作用を、そのLH-RH拮抗類似体との共役結合体、[D-Lys⁶] LH-RH (各々 Q_1 '⁴gL及び Q_2 '⁴gL)との比較して表わす。

第18-1表

化合物	培養 時間 (時間)	濃度 (M) における MCF-7 セルラインの T/C 値							
		3×10^{-11}	10^{-10}	3×10^{-10}	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	3×10^{-8}	10^{-7}
ドキシソルピシン Q_1 14 g/L Q_6 Q_8 14 g/L	70						98	82	54
	120						95	66	33
	70						111	89	63
	120						78	55	28
	70		50		-3	-18			
	120		26		-2	-9			
	70		74		28	-24			
	120		60		16	-14			
化合物	培養 時間 (時間)	濃度 (M) における MXT セルラインの T/C 値							
		3×10^{-11}	10^{-10}	3×10^{-10}	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	3×10^{-8}	10^{-7}
ドキシソルピシン Q_1 14 g/L Q_6 Q_8 14 g/L	26						85	90	59
	50						74	60	43
	26						87	91	73
	50						71	59	50
	28	90	78	56					
	69	52	6	-13					
	28	91	78	64					
	69	59	15	-11					

MCF-7細胞を96ウェルプレート上で5%HI-DCC-FBSを含有するIMEM培地中で培養した。MXT細胞はL-グルタミン0.6g/l及びF

BS10%を含有するRPMI1640培地中で培養した。第17-1と同様にして測定した。

例19

第19-1表は、本発明のDOXを含有するソマトスタチン類似体の試験管内

細胞毒性活性が完全に保持されることを示している。

第19-1表：試験管内におけるM I I A P a C a - 2ヒト膵臓癌セルラインの増殖に対するドキソルビシンを含有するソマトスタチンの細胞毒性類似体の効果

化合物	培養時間 (時間)	濃度 (M) における T/C 値		
		10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
DOX ¹⁴ -O-glt-S-98* (Q ₁ ¹⁴ gS ⁹⁸)	28	93	95	32
	76	103	11	-3
キャリア類似体 S-98*	28	-	-	96
	76	-	-	98
DOX ¹⁴ -O-glt-S-121** (Q ₁ ¹⁴ gS ¹²¹)	28	93	82	35
	76	97	10	-4
キャリア類似体 S-121**	28	-	-	76
	76	-	-	96
ドキソルビシン	28	95	64	-28
	76	71	10	-7

細胞を96ウェルプレート上で胎児牛血清10%を含有するRPMI1640培地中で恒温保持した。



例 20

試験管内におけるCFPAC-1ヒト膵臓癌細胞の増殖に対する、ドキソルビシンを含有するボンベシン拮抗物質細胞毒性類似体の効果

第20-1表は、試験管内における本発明のDOXを含有するボンベシン拮抗物質類似体の細胞毒性活性が完全に保持されることを示している。

第 20-1 表

化合物	培養時間 (時間)	濃度 (M) における T/C 値			
		3×10^{-5}	10^{-7}	3×10^{-7}	10^{-6}
DOX ¹⁴ -O-glt	66	95	81	44	9
B-94	95	95	57	28	4
(Q ₁ ¹⁴ gB)	137	94	28	19	0
B-94*	66	99	106	104	100
	95	97	99	99	96
	137	98	98	100	96
DOX ¹⁴ -O-glt-B-50	66	102	78	39	5
	95	97	55	24	-1
	137	92	28	19	-2
B-50**	66	100	93	99	93
	95	98	100	102	98
	137	97	98	99	98
DOX	66	88	52	15	-7
	95	73	32	10	-6
	137	49	20	7	-4

細胞を、24 ウエルプレート上で胎児の牛血清 10% を含有する IMDM 培地
中で恒温保持した。

* Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Ψ (CH₂-N)-Leu-NH₂

* * D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Ψ (CH₂-N)-Tac-NH₂

ホルモン誘導体の保持結合特性

例 21

キャリアペプチド、[D-Lys⁶] LH-RH と比較した、細胞毒性 LH-RH
アゴニスト類似体 Q₁¹⁴

g L ([D-Lys⁶] LH-RH carrying DOX 及び Q₁¹⁴g L ([D-
-Lys⁶] LH-RH carrying 2-ピロリノール DOX のホルモン活性
及び受容体結合力

第 2 1 - 1 表

化合物	ホルモン活性 [*] (LH-RH=1 に対する LH-応答)	ラット下垂体受容体 の IC50 ^{**} 値 (nM)	乳癌受容体の IC50 ^{**} 値 (nM)
Q ₁ ¹⁴ gL	15	2.29	7.24
Q ₆ ¹⁴ gL	10	5.59	6.70
[D-Lys ⁶]LH-RH	8	2.26	1.80

第 2 1 - 1 表中、

*類似体に対する LH 応答は、S. V i g h 及び A. V. S c h a l l y、P e p t i d e s 5、241～247 頁（1984 年）に記載されているようにして、分散ラット下垂体細胞過溶解系で測定した。

**ラット下垂体 LH-RH 受容体及びヒト乳癌受容体に対する類似体の結合親和性は、B. S z o k e その他、P e p t i d e s、第 15、(2) 巻、359～366 頁（1994 年）に記載されているようにして、ラジオリガンドとしての [125I] 標識付き [D-Trp⁶] LH-RH を使用する拮抗結合実験で測定した。結合親和性は、ラジオリガンドの特異的結合を 50% 抑制するのに必要な非標識付き類似体の濃度である IC50 値で表わした。

例 2 2

ソマトスタチン類似体は、C a r i s o n その他著、T h r o t r o p i n - r e l e a s i n g h o r m o n s t i m u l a t i o n a n d s o m a t o s t a t i n i n h i b i t i o n o f g r o w t h h o r m o n e s e c r e t i o n f r o m p e r f u s e d r a t a d e n o h y p o p h y s e s E n d o c r i n o l o g y、第 94 巻、1709（1974 年）に記載されているように、灌流ラット下垂体からの成長ホルモン（GH）の分泌を抑制する。従って、この方法は本発明の細胞毒性ソマトスタチン類似体を、ホルモン活性に関して、その親キャリア分子と比較するために使用した。

ソマトスタチン類似体 S-98-1



及び S - 1 2 1



による、灌流ラット下垂体細胞からのヒト成長ホルモン放出ホルモン (hGH-RH (1-29) NH₂) 誘発成長ホルモン放出の抑制と各々その細胞毒性誘導体、Q₁¹⁴gS⁹⁸⁻¹ (DOX¹⁴-O-gl-t-S-98-1) 及び Q₁¹⁴gS¹²¹ (DOX¹⁴-O-gl-t-

S-121) との比較。

ラット下垂体灌流系中で、ソマトスタチン類似体を hGH-RH (1-29) NH₂ 1 n モルと同時に、1 n モル用量で 3 分間投与した。ソマトスタチン類似体の注入は更に 6 分間保持した。hGH-RH (1-29) NH₂ 1 n モルの 3 分間投与に対する GH 応答をソマトスタチン類似体灌流中 (0 分) 及び投与中止後 30、60 及び 90 分後に測定した。データは第 22-1 表に記載した。

第 22-1 表

ソマトスタチン 類似体	ソマトスタチン類似体の注入後の異なる時点における hGH-RH(1-29)NH ₂ 1 n モルの 3 分間投与により誘発された GH 放出 **			
	0 分	30 分	60 分	90 分
S-98-1	2.9	94.7	117.6	-
Q ₁ ¹⁴ gS ⁹⁸	0	90	89.7	-
S-121	7.8	62.2	57.3	77.9
Q ₁ ¹⁴ gS ¹²¹	8.8	58.5	54.3	67.7

**ソマトスタチン類似体投与前に hGH-RH (1-29) NH₂ 1 n M の 3 分間注入により誘発した GH 放出の % として表わした。

例 23

細胞毒性ポンペシン類似体を用いる受容体結合試験

Bio-Rad Enzymobead Radio 沃素化キットを用いる

[Tyr⁴] BN (Sigma) の放射沃素化及びモノ-沃素化 [¹²⁵I-Tyr⁴] BN の単離を前記したようにして行った (1)。標識付き [Tyr⁴] BN の結合及び細胞毒性ポンペシン拮抗物質類似体、Q₆¹⁴gB による置換を融合性 Swiss 3T3 細胞 (American Type Culture Collection から入手) を使用して 24 ウエルプレート中で Kris その他 の方法 (3) の変法 (2) で行った。播種してから 3~4 日間後に、融合性細胞を Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) で 2 回洗浄し、総容量 0.5 ml の結合緩衝剤 [HEPES 50 ミリモル、牛血清アルブミン (BSA) 0.1%、MgCl₂ 5 ミリモル及びバシトラシン 100 μg/ml を有する DMEM、pH: 7.4] 中で、種々の濃度の非標識付き競合体 (Q₆¹⁴gB 又は BN) の不在又は存在下で、[¹²⁵I-Tyr⁴] BN 50 pM と一緒に 37℃ で 30 分間恒温保持した。非特異的結合を非標識リガンド 1 μM の存在で測定した。BSA 0.1% を含有する氷冷 HBSS (pH: 7.4) で 3 回洗浄した後、細胞をトリプシン 0.05% / EDTA 溶液 0.53 ミリモルを用いて分離し、管に移した。放射能を γ-カウンター (MicroMedic Systems Inc.) (Huntsville, AL) を用いて測定した。結合データを McPherson による放射リガンド結合分析プログラムを用いて評価した (4)。第 23-1 表に記載の K_i

値は、Cheng 及び Prusoff (5) の式により算出した。

1. Halmos, et al., Cancer Letters, 85:111-118 (1994)
2. Cai, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:12664-12668. (1994.)
3. Kris, et al., J. Biol. Chem. 262:11215-11220, (1987.)
4. McPherson, G. A., J. Pharmacol. Methods, 14:213-228, (1985)
5. Cheng and Prusoff, Biochem. Pharmacol. 22:3099-3108, (1973)

第 23-1 表

ポンペシンと比較した、Swiss 3T3 セルラインに対するポンペシン受容体への細胞毒性ポンペシン拮抗物質 Q₆¹⁴gB (2-ピロリノ-D OX¹⁴-O-

g l t - G l n - T r p - A l a - V a l - G l y - H i s - L e u - ϕ - (C
H₂ - N) L e u - N H₂ の特異的結合の特性付け

化合物	Ki (nM)
ボンベジン	1.2
Q ₁ ¹⁴ gB	1.0

ホルモン共役結合体対細胞毒性ラジカル単独の比較有効性及び毒性

例 2 4

エストロゲン非依存性 M X T マウス乳癌 (K S - 4 9) に対する 2 - ピロリノ -
D O X (Q₀) 、細胞毒性 L H - R H 作用物質類似体 Q₀¹⁴g L (Q₀¹⁴-O-ヘミ
グルタレートに結合した [D - L y s⁰] L H - R

H) 及び (D O X) を用いる治療

細胞毒性ドキソルビシン誘導体、Q₀及びその標的細胞毒性ペプチド共役結合
体、Q₀¹⁴g L 並びに公知抗腫瘍剤、D O X の腫瘍抑制作用を比較し、最適投与
法及び無毒用量を決めるために、L H - R H 受容体陽性 M X T (3 . 2) o v e
x 腫瘍片 (1 m m³) を雌の B₆D₂F₁ マウスに皮下移植した。移植してから 1 日
後にマウスを 5 つの動物群に無作為に分け、治療を開始した。化合物を 0 . 1 %
トリフルオル酢酸 (p H 2) 中に溶解させ、腹腔内に投与した。群、治療法及び
用量並びに平均生存時間を第 2 4 - 1 表に記載した。結果を第 2 4 - 2 表及び第
1 図にまとめた。

第 2 4 - 2 表は、Q₀及び細胞毒性 L H - R H 類似体 Q₀¹⁴g L を用いる治療の
エストロゲン非依存性乳癌マウスの腫瘍容量及び生存に対する作用を表わしてい
る。第 2 4 - 2 表から明らかなように、1、2、7、8、14 及び 15 日目に投
与した Q₀ 1 . 2 5 n モル (群 2) が平均生存時間 1 7 . 4 日で特性付けられる
強い毒性を生じ、これは未治療対照群の生存より有意に短い。これに対して、同
じ用量の Q₀¹⁴g L (群 6) は平均生存時間 3 0 . 8 日であり、これは未治療対
照群より有意に長い。Q₀に対する Q₀¹⁴g L のより高い有効性は、群 2 (1 6 日
目で 1 0 6 5 m m³) 及び群 6 (3 1 日目で 8 6 3 m m³) における平均最終腫瘍

容量を比較することによっても実証される。

薬剤 0.5 n モルを 3 週間連続で 1 週間に 5 日間投与した別の治療方法で Q₀ と Q₀¹⁴ g L を比較することによって、同様の結論が実証されうる。

ドキソルビシンは有毒用量（総量：1560 n モル、平均生存：20 日間）で腫瘍を撲滅させることができなかったが、Q₀¹⁴ g L を無毒用量で用いる治療（総量：7 n モル、平均生存：> 31 日間）によって、5 匹中 2 匹の動物が腫瘍を生じることなしに生存していた。

第 2 4 - 1 表

群番号	投与	用量/注射 (nモル)	用量/ 注射 (μg)	注射/週	注射の間 の日数	投与週	総量	平均 生存* 日数
1	対照							22
2	Q ₆	1.25	0.92	2	5		7.5	17.5
3		0.5	0.37	5	2			19.6
4		0.25 *	0.19					14.6
5		0.2	0.15					13.0
6	Q ₆ ¹⁴ g/L	1.25	2.9	2	5	3	7.5	30.8
7		0.5	1.16	5	2			26.8
8		0.25 *	0.58					18.4
9		0.2	0.46					13.6
10		3.5	8.12	1	6	2	7	>31
11		4	9.28				8	
12		5	11.6				10	13.4
13	DOX	520	340			3	1560	20.0

* 9 日から 12 日、用量を 2.5 n モルに増やした。9 日から 12 日、用量を 5.0 n モルに増やした。

*生存

第 2 4 - 2 表

No	群	投与方法					最終 腫瘍 容量 (mm ³)	測定日	平均生存 (日数)	各群当り 5匹のマ ウスから の腫瘍の ない生存 マウスの 数	
		用量/ 注射 (μ モル)	週当りの 注射	注射間の 休み (日数)	治療 期間 (週)	注射した 総量 (μ モル)				18日	31日
1	対照						7122	21	22.0 \pm 1.6	0	0
2	Q ₁	1.25	2	5	3	7.5	1065	16	17.4 \pm 0.2	0	0
6	Q ₁ ' ₂ L	1.25	2	5	3	7.5	863	31	30.3 \pm 0.4 **	2	0
3	Q ₁	0.5	5	2	3	7.5	2531	18	19.6 \pm 0.7	0	0
7	Q ₁ ' ₂ L	0.5	5	2	3	7.5	3978	31	26.8 \pm 2.6 **	1	0
10	Q ₁ ' ₂ L	3.5	1	6	2	7	669	31	>31 **	4	2
12	Q ₁ ' ₂ L	5.0	1	6	2	10	0	10	13.4	0	0
13	DOX	520	1	6	3	1560	1560	28	20	1	0

**ダンカン試験を用いて対照データと比較して、生存は有意に長い ($p < 0.01$)、生存は有意に短い ($p < 0.01$) 又は ($p < 0.05$)。

例 2 5

エストロゲン非依存性MXTマウス乳癌 (KS-55) に対する (DOX)、細

胞毒性 LH-RH 類似体 T-107 及び Q_{14} の単一治療の効果

試験化合物：

Q_{14} : [D-Lys⁶] LH-RH に結合したドキソルビシン¹⁴-O-ヘミグルタレート

T-107 : [D-Lys⁶] LH-RH に結合した N-グルタリル-ドキソルビシン、Proc. Natl. Acad. Sci. 第 89 巻、972~976 頁 (1992 年) ; 及び

DOX

分析は下記のようにして行った：

最高許容用量を決め、効果を比較するために、MXT (3.2) over 腫瘍片 (1 mm²) を雌の B₆D₃F₁ マウスに皮下移植した。移植してから 1 日後にマウスを 5 つの動物群に無作為に分け、それらを 1 回の腹腔内注射で治療した。群及び用量を第 25-1 表に記載する。この表には、各群に関して容量測定時に腫瘍を有していたマウスの数及び平均生存時間も記載してある。腫瘍容量変化を第 2 表に記載する。化合物を 0.1% TFA (pH: 2.0) 中に溶解させた。腫瘍容量は 10、13、17 及び 20 日目に測定した。

第 25-1 表及び第 2 図から明らかなように、T-107 (N-グルタリル-DOX に結合した [D-L

ys⁶] LH-RH) は、850 n モル/マウス 20 g の用量でこの腫瘍の増殖抑制において全く無効である。これに対して、 Q_{14} (14-O-グルタリル-DOX に結合した [D-Lys⁶] LH-RH) は、無毒用量 650 n モル/マウス 20 g で腫瘍増殖の著しい抑制を生じた (図)。DOX 単独では 650 n モル/マウス 20 g の単一用量で高い毒性を示し (平均生存時間: 13.6 日間)、 Q_{14} より効果が有意に少なかった (第 2 図)。

第 2 5 表

No.	群	用量			腫瘍マウスの数/ 生存マウスの数				平均生存 日数
		nmol/ 20 g	μg/ 20 g	μmol/kg	日 10	日 13	日 17	日 20	
1	対照				5/5	5/5	5/5	5/5	21.2±0.3
2	Q ₁ ¹⁴ gL	680	1520	34	1/4	2/4	2/4	3/4	28.6±693 5.3±25**
3	Q ₁ ¹⁴ gL	710	1587	35.5	2/4	3/4	3/4	3/4	26.0±663 2.0±34*
4	Q ₁ ¹⁴ gL	760	1698	38	3/5	4/5	4/5	(Sacr.)	(Sacr.)
5	DOX	650	427	32.5	3/3	2/2	1/1	1/1	13.6±25
6	DOX	700	460	35	2/3	2/3	2/2		15.2±24
7	DOX	750	493	37.5	1/1				7.8±1.3
8	T-107	750	1676	37.5	5/5	5/5	5/5	4/4	21.8±05
9	T-107	850	1900	44.4	5/5	5/5	5/5	4/4	21.6±07

*生存は対照より有意に短い ($p < 0.01$)

**対照と比較して、生存は有意に長い ($p < 0.01$) 又は* ($p < 0.05$)

(事故により2日目に死亡したマウス1匹はこれらの2群から除外した)。

例 2 6

エストロゲン非依存性MXTマウス乳癌(KS-47)に対する細胞毒性LH-RH類似体の効果

治療に使用される物質

先の実験では1日の用量20nmolで17日間ではQ2は腫瘍増殖に対する軽度の抑制作用しか有さず、40nmol用量では有毒であった(平均生存は14.6日間)。本発明の実験のために、は30nmolの1日の用量を選択し、これをQ₂¹⁴gL([D-Lys⁶]LH-RHに結合したQ₂)、Q₂(イロリジノード

キソルピシン)、 $[D-Lys^6]$ LH-RH及び $[D-Lys^6]$ LH-RH+ Q_2 の効果及び毒性と比較した。

MX T (3. 2) o v e x 腫瘍片 (1 mm^3) を雌のB₆D₃F₁マウスに移植した。治療は移植してから1日後に開始し、1日1回腹腔内注射を12日間続けた。全ての群に、第26-1表に記載したように当モル量の化合物を投与した。腫瘍を10、14及び18日目に測定し、腫瘍容量を計算した。データを第26-1及び第3図に記載する。

ダウノサミン変性ドキシソルピシン類似体 Q_2 (ピロリジノ-D O X) 30 nモルの1日用量で治療することによって、腫瘍増殖に対する強力な抑制が生じた (腫瘍容量: 14日目で 144 mm^3 対対照群の 1391 mm^3) が、実験終了前に全動物を殺す強烈な毒性 (平均生存17. 9日間) を生じた。同様に、 $[D-Lys^6]$ LH-RHと結合した Q_2 (混合物) も強力な抑制効果を生じた (腫瘍容量: 14日目で80 m

mm^3) が、平均生存 (18. 5日間) は未処理対照群 (23. 1日間) より有意に短かった。 Q_2 ' ' g L ($[D-Lys^6]$ LH-RHと共役結合した Q_2) を用いる治療の結果として、2匹の動物が死亡したが、1匹は16日目に、1匹は26日目に死亡した。生存していた8匹の動物から18日目の最後測定時に1匹だけが腫瘍が生じ、動物は全て健康に見えたが、後に全ての動物で腫瘍が発生し始めた。この群の平均生存は、対照群より有意に長かった (28. 3日間)。D-Lys⁶] LH-RH単独を用いた治療では腫瘍増殖に効果がなかった。

この実験により、細胞毒性基 Q_2 に対する Q_2 ' ' g Lの高い効果及び低い末梢毒性が、標的キャリアLH-RH類似体に対する細胞毒性基の共役結合に起因することが実証される。

第26-1表

エストロゲン非依存性MX Tマウス乳癌の増殖及び腫瘍を有するマウスの生存に対する細胞毒性LH-RH類似体の作用

No	治療	用量 ($\mu\text{g}/\text{日}$)	マウス の数	平均腫瘍容量 (mm^3)			移植後の平均生存 (日数)
				10日	14日	18日	
1	対照		15	253	1391	4794	23.1
2	Q_2^{14}gL	68.7	10	33	16	23	28.3 *
3	Q_2	21.3	10	153	144	137	17.9
4	$[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$	48.0	10	165	1348	4003	23.5
5	$[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$ + Q_2	48.0 + 21.3	10	121	80	27	18.5

1日の用量は全て30nモル当量である。

対照より有意に短い ($p < 0.05$)

*ダンカン試験で対照より有意に長い ($p < 0.01$)。

例27

アンドロゲン依存性ラットDunning R-3327-H前立腺癌の増殖に対する、2-ピロリノ-D O X (Q_2) 及び細胞毒性LH-RH作用物質類似体 Q_2^{14}gL ($\text{Q}_2^{14}\text{-O-O-ヘミグルタレートに結合した}[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$) の効果

ホルモン依存性Dunning R3327-H前立腺癌を有する雄のコペンハーゲンラットを、2-ピロリノドキシソルピシンに結合した作用物質 $[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$ から成る黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)の新規細胞毒性類似体である、 Q_2^{14}gL で処理した。最初の実験で、2-ピロリノドキシソルピシンを50nモル/kgの濃度で、単独薬剤(Q_2)として及び $[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$ との非共役混合物として又はキャリアとの共役結合体($[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}(\text{Q}_2^{14}\text{gL})$)として、投与した。基 Q_2 単独又は $[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$ と混合して50nモル/kgの2番目の投与後に、ラットは全て全身毒性症状で死亡したが、細胞毒性LH-RH共役結合体 Q_2^{14}gL で処理した動物は全て生き残った。全用量150nモル/kgの Q_2^{14}gL を用いる治療5週間後に、実験開始時の $8.35 \pm 1.7\text{cm}^3$ の元の容量から 4.47

$\pm 0.8 \text{ cm}^3$ に減少したが、対照群の腫瘍は増殖し続け、 $17.84 \pm 2.2 \text{ cm}^3$ になった。 Q_6 、 $^{14}\text{g L}$ を用いる治療も腫瘍重量及び腫瘍障害を有意に減少させた。 Q_6 及び Q_6 、 $^{14}\text{g L}$ の効果及び毒性を比較するための第2の実験で、治療方法は $Q_6 25 \text{ nモル/kg}$ 又は Q_6 、 $^{14}\text{g L } 25 \text{ nモル/kg}$ 及び 50 nモル/kg の3種類の投与から構成されていた。治療を開始した場合に、全ての群の腫瘍容量は $3.9 \sim 4.5 \text{ cm}^3$ であった。治療5週間

後に、未治療動物では $15.6 \pm 2.2 \text{ cm}^3$ であるのに比較して、 Q_6 、 $^{14}\text{g L } 50 \text{ nモル/kg}$ で治療したラットで腫瘍は $2.3 \pm 0.51 \text{ cm}^3$ にも減少したが、 $Q_6 25 \text{ nモル/kg}$ はまだ有毒であり、 Q_6 、 $^{14}\text{g L } 25 \text{ nモル/kg}$ を用いて得られた値($6.74 \pm 1 \text{ cm}^3$)と同様に、最終腫瘍容量 $6.76 \pm 1.4 \text{ cm}^3$ へ減少させることができたにすぎなかった。試料の組織学的評価から、 Q_6 、 $^{14}\text{g L}$ 治療群のみで有糸分裂細胞の有意な減少が示された。高結合力を有するLH-RH受容体が未治療Dunnings腫瘍試料の膜から検出されたが、 Q_6 、 $^{14}\text{g L}$ で治療後にはLH-RHの結合部位は検出されなかった。AN-201及び Q_6 、 $^{14}\text{g L}$ による腫瘍増殖の抑制はEGF受容体の結合力の有意な減少と関係があった。第4～6図により示されている様に、標的細胞毒性LH-RH類似体 Q_6 、 $^{14}\text{g L}$ は、ラットDunnings R-3327-H前立腺癌の抑制を生じる有効な抗腫瘍剤である。本試験は、細胞毒性LH-RH類似体 Q_6 、 $^{14}\text{g L}$ が、組み込まれた抗新生物基(Q_6)より遥かに毒性が少なく、腫瘍増殖の抑制作用が有意に高いことも示している。

例27に関する図の説明

第4図。実験I：作用物質[$D-Lys^6$] LH-RH 50 nモル/kg 及び細胞毒性LH-RH類似体 Q_6 、 $^{14}\text{g L } 50 \text{ nモル/kg}$ の3種類の投与から成る治

療の間の、ラットDunnings R-3327-H前立腺癌移植を有する雄のコペンハーゲンラットにおける腫瘍容量。垂直線はダンカン新多重範囲試験による対照に対するSEMが $*p < 0.05$ ； $**p < 0.01$ を示している。矢印により示される治療は1、8及び29日目に行う。 $\uparrow Q_6$ を単独薬剤として、又は[

D-Lys⁶] LH-RHとの非共役結合混合物として、用いて治療した動物は、第2週内に死亡した。この二つの群で8日目に記録した腫瘍容量が示されている。

第5図。実験 I I : D u n n i n g R - 3 3 2 7 - H 前立腺癌を有するラットにおける腫瘍容量に対する2-ピロリノドキソルピシン (Q₆) 25 nモル/kg、細胞毒性 LH-RH類似体 Q₆-¹⁴g L 25 nモル/kg 及び 50 nモル/kg を用いる治療の効果。垂直線は対照に対する S E M * p < 0.05 ; ** p < 0.01 を示す。矢印により示される治療は3回、即ち1、8及び29日目に行った。

第6図。実験 I I : D u n n i n g R - 3 3 2 7 - H 前立腺癌を有するコペンハーゲンラットの体重に対する2-ピロリノドキソルピシン (Q₆) 25 nモル/kg、細胞毒性 LH-RH類似体 Q₆-¹⁴g L 25 nモル/kg 及び 50 nモル/kg を用いる治療の効果。垂直線は対照に対する S E M * p < 0.05 ; ** p < 0.01 を示す。矢印により示される治療は3回、

即ち1、8及び29日目に投与した。

例 2 8

ヌードマウスにおける OV-1063 ヒト卵巣癌の増殖に対するドキソルピシン (DOX) 及び標的細胞毒性 LH-RH 作用物質類似体 Q₁-¹⁴g L (DOX¹⁴-O-ヘミグルタレートに結合した [D-Lys⁶] LH-RH) の作用の比較

ヒトの上皮卵巣癌セルライン OV-1063 は、57才の女性の卵巣の転移性乳頭状嚢腺癌からのものであった (H o r o w i t z その他 (1985年) O n c o l o g y 42、332~337頁)。OV-1063の細胞1千万個を3匹のヌードマウスに皮下注射して腫瘍を増殖させた。これら腫瘍片 1 m m³ を生体内増殖抑制試験のために6匹の動物中に移植した。この実験の目的は、OV-1063の LH-RHの受容体の存在の結果として LH-RHの細胞毒性共役結合体が、それが含有する細胞毒性基である DOX よりも効果が大きく、毒性が少ないことを実証することであった。従って細胞毒性 LH-RH共役結合体の効果を、DOX、DOXとキャリア分子との混合物、キャリア単独及び未治療対照群の効果と比較した。注射は全て腹腔内に行った。化合物は水中の0.9%塩化ナ

トリウム（食塩水）中に溶解させた。

平均腫瘍の大きさ約 15 mm^3 のマウスを動物 9 匹の 6 群に分け、腫瘍移植 7 日後に次の治療を行った：

群 1、食塩；群 2、 $700 \text{ nモル} / \text{動物 } 20 \text{ g}$ の用量の Q_{114}gL ；群 3、 $413 \text{ nモル} / \text{動物 } 20 \text{ g}$ の用量（最高許容量、DOX の MDT）の Q_{114}gL ；群 4、 $413 \text{ nモル} / \text{動物 } 20 \text{ g}$ の用量（MDT）の DOX；群 5、 $700 \text{ nモル} / 20 \text{ g}$ の DOX 及び $700 \text{ nモル} / 20 \text{ g}$ の $[\text{D-Lys}^6]$ LH-RH の混合物；群 6、 $700 \text{ nモル} / 20 \text{ g}$ の用量のキャリア作用物質類似体 $[\text{D-Lys}^6]$ LH-RH。

OV-1063 の受容体分析により、LH-RH の高い親和結合部位の存在が判明した。

結果：第 7 図で明らかなように、腫瘍増殖の強力な抑制が $413 \text{ nモル} / 20 \text{ g}$ 用量の Q_{114}gL を用いる治療（群 3）によって達成された。動物には重度の毒性兆候は観察されなかった。これに対して、 $413 \text{ nモル} / 20 \text{ g}$ の同じ用量で投与された DOX を用いる治療（ $12 \text{ mg} / \text{kg}$ 、MTD、群 4）によっては、実験終了時に生き残っていた 3 匹の動物で腫瘍増殖の有意な抑制は生じてなかった。毒性のために 3 匹の動物が 5 日目に、6 匹の動物が 9 日目に死亡した。より高い用量（ $700 \text{ nモル} / 20 \text{ g}$ 、群 2）では、 Q_{114}gL は腫瘍増殖抑制の非常に強力な抑制を生じた（第 7 図）。9 匹の動物中 2 匹が毒性のために死亡し、1 匹の動物が事故により死亡した。6 匹の生き残った動物は実験終了時に約 20 % の体重減少から回復した。群 6 で同じ高用量（ $700 \text{ nモル} / 20 \text{ g}$ ）の DO

X を 700 nモル の $[\text{D-Lys}^6]$ LH-RH と混合した。5 日目までにこの群の動物は全て重度の毒性の結果死亡した。

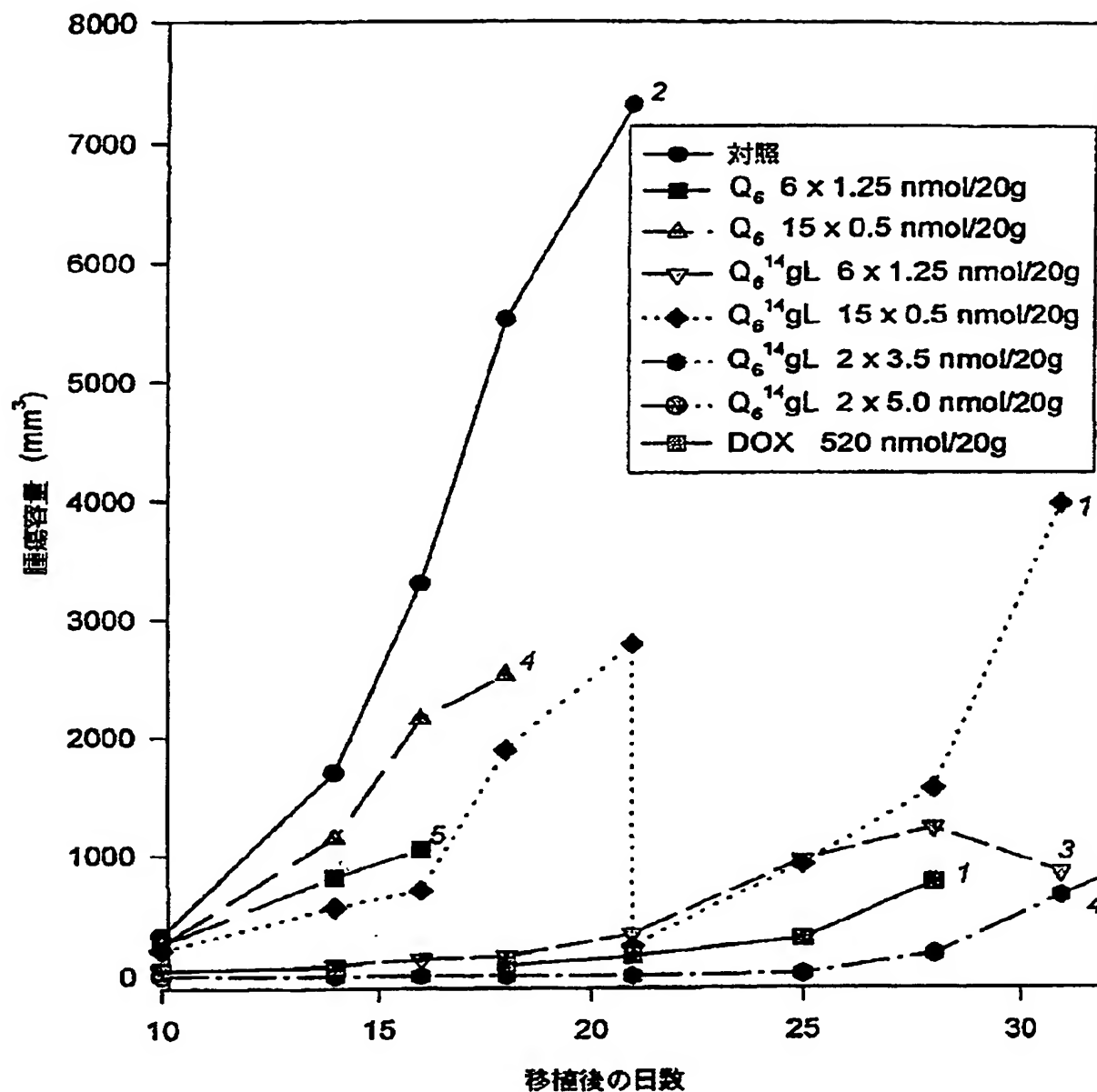
結論：我々の結果から、上皮卵巣癌の細胞 OV-1063 上の LH-RH の受容体の存在により、標的細胞毒性 LH-RH 共役結合体 Q_{114}gL が、それが含有する細胞毒性基、ドキソルビシン（ Q_1 ）より毒性が低く、抗腫瘍作用が高いことが明白に実証している。

【 図 1 】

第 1 図

KS-29 のエストロゲン非依存性 MXTマウス乳癌の容量変化

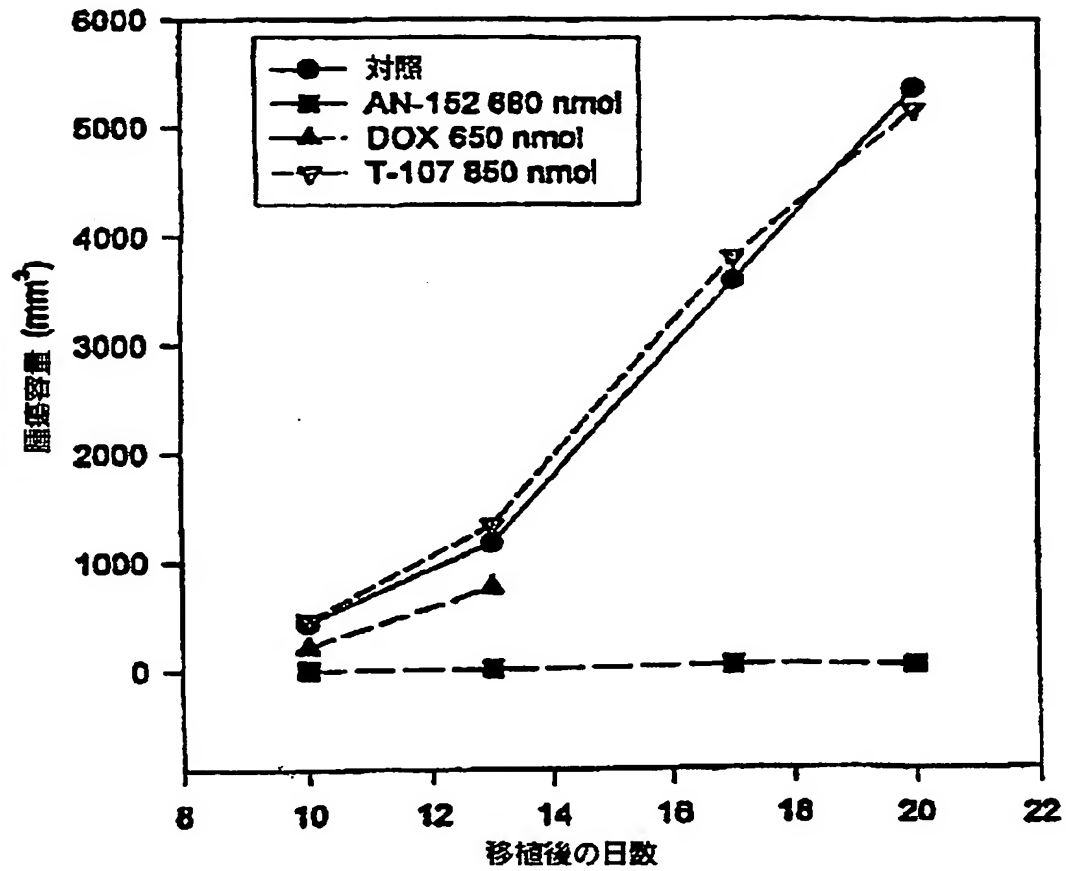
(イタリック体の数字は、測定時の生存マウスを表わす)



【 図 2 】

第 2 図

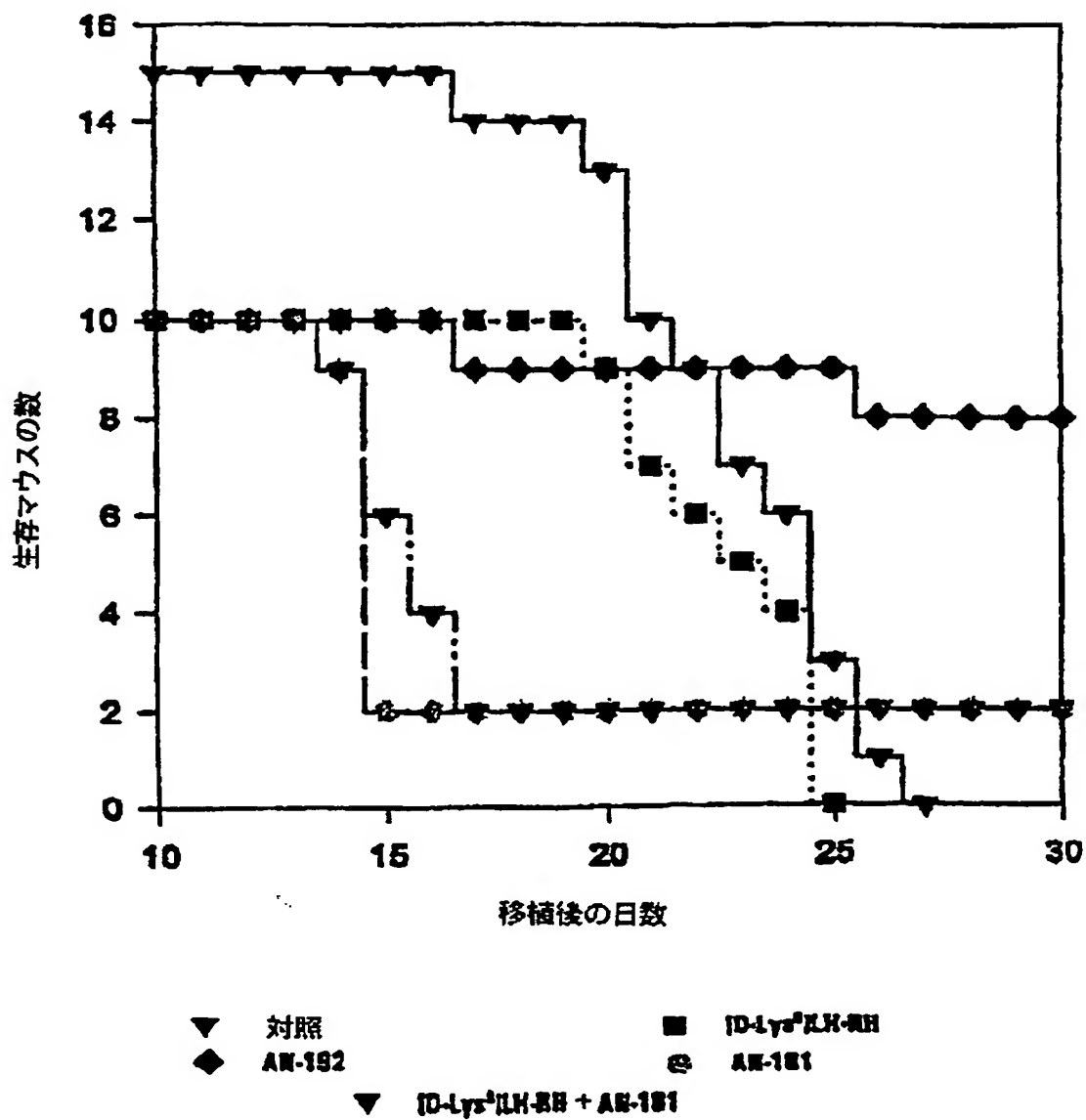
KS-55 におけるエストロゲン非依存性 MXT 腫瘍の容量変化
(選択された群)



【 図 3 】

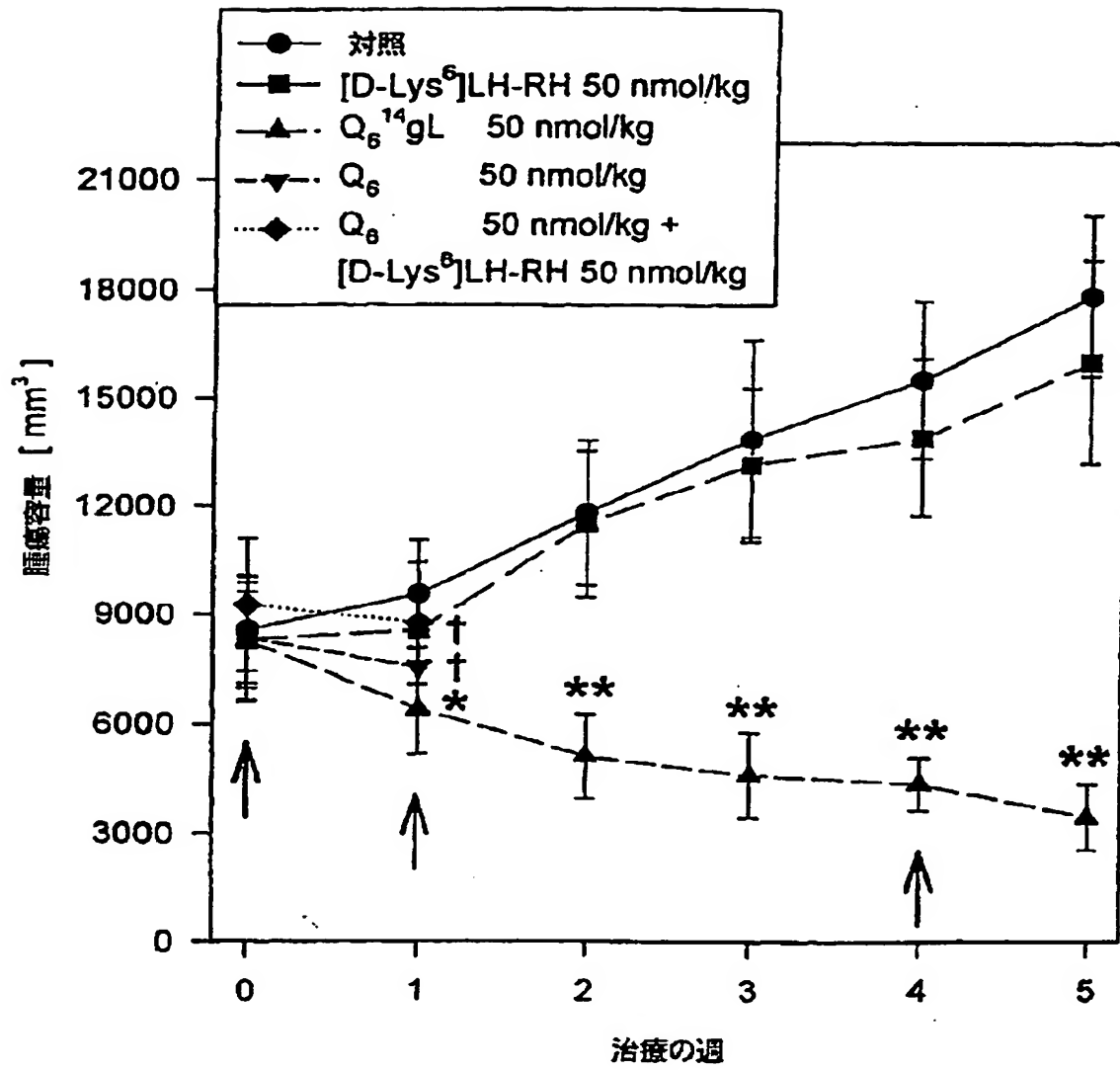
第3図

エストロゲン非依存性 MXT 癌を有するマウスの生存に対する
細胞毒性 LH-RH 類似体の効果



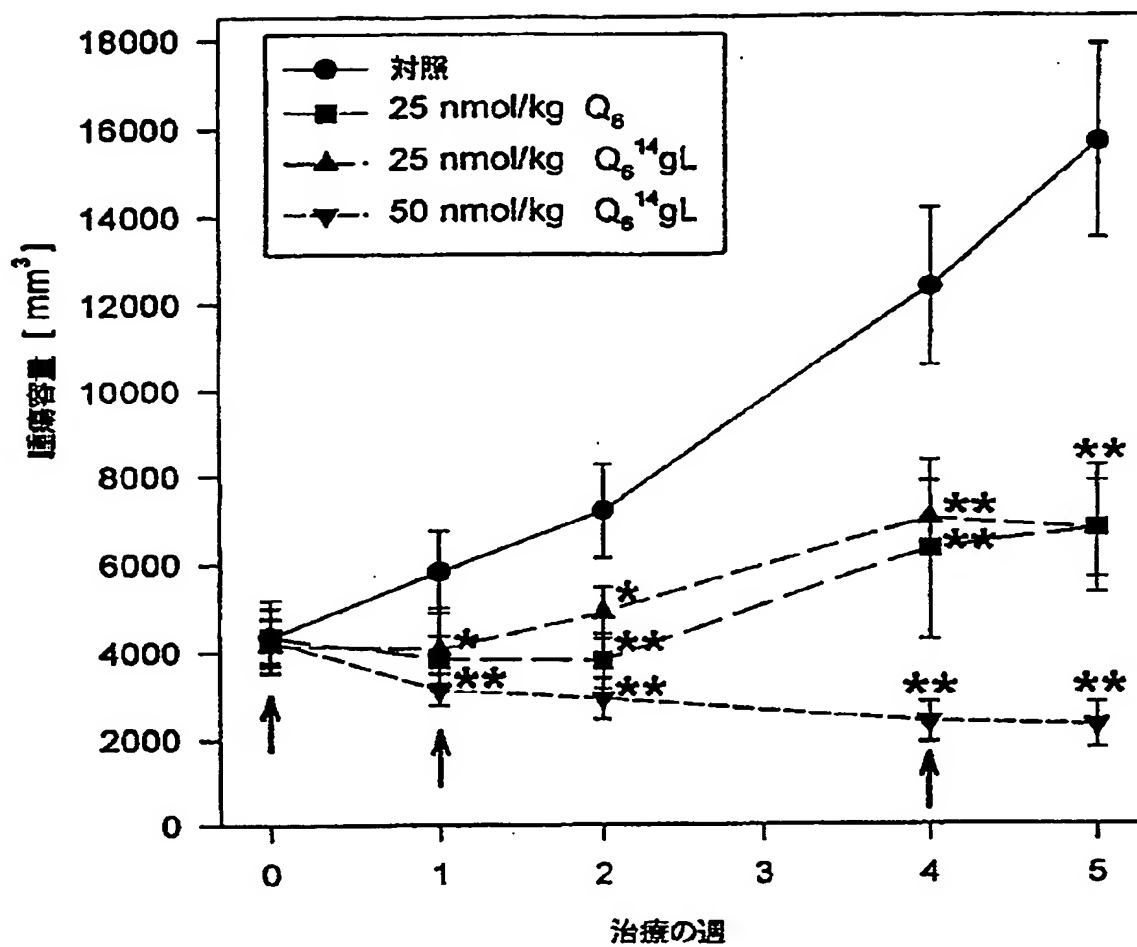
【 図 4 】

第 4 図



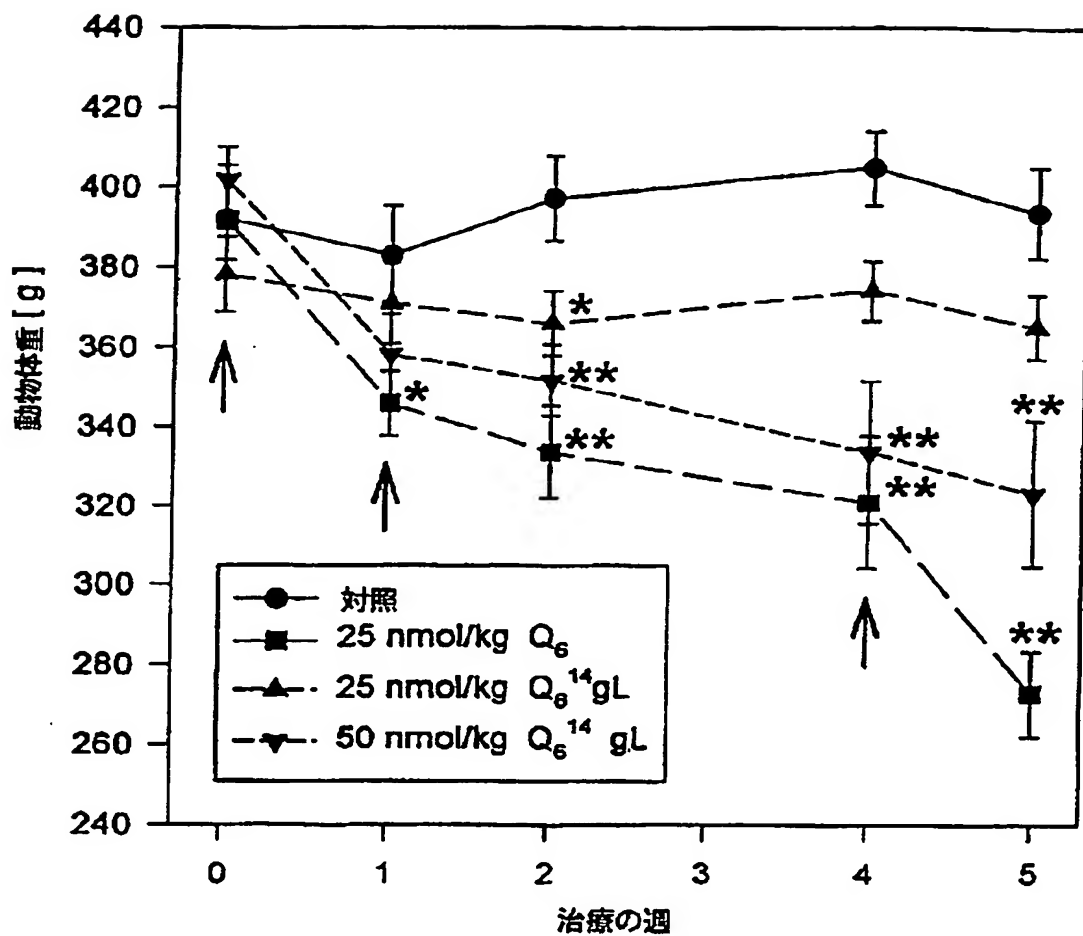
【 図 5 】

第 5 図



【 図 6 】

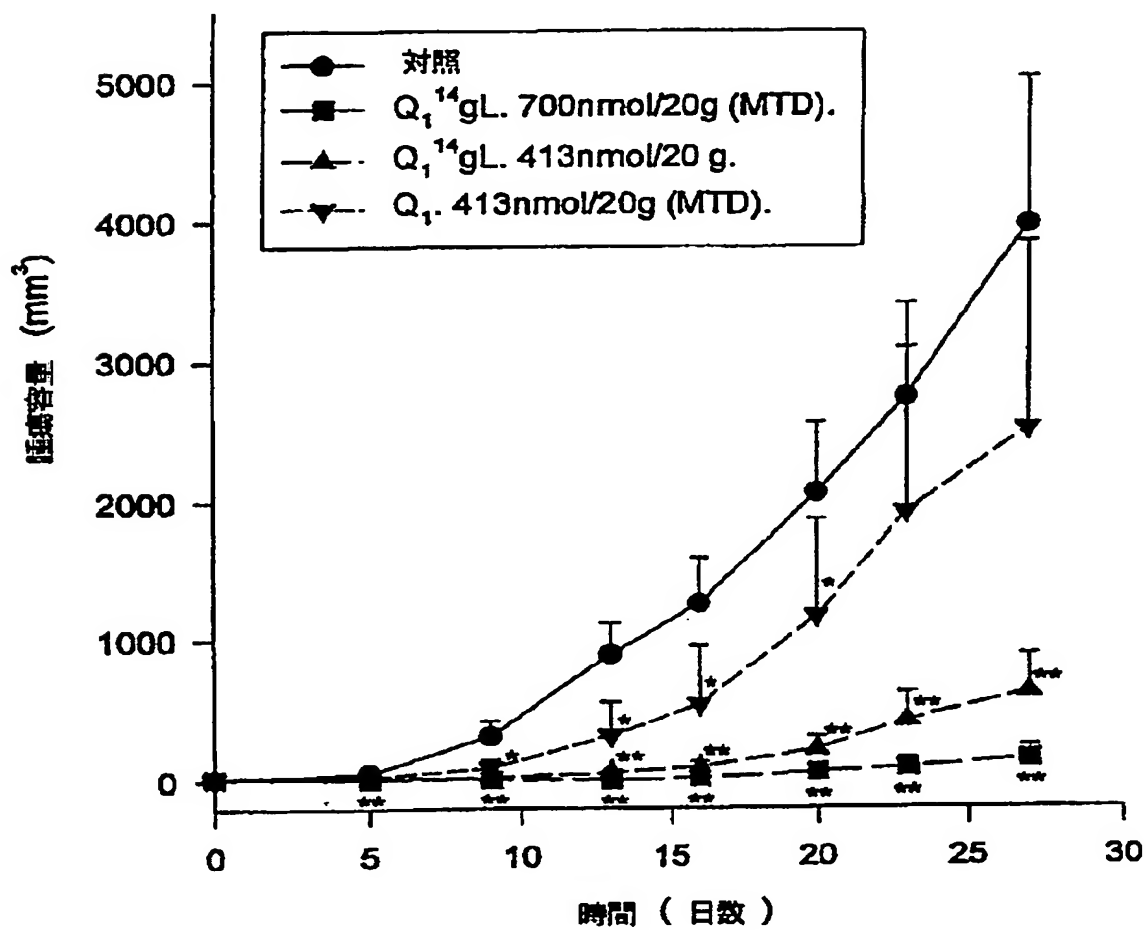
第6図



【 図 7 】

第 7 図

ドキソルビシンを含有する細胞毒性 LH-RH 類似体 (Q_1^{14} gL) 及び
 ドキソルビシン (Q_1) によるヌードマウスにおける OV 1063
 ヒト卵巣癌移植片の増殖の抑制



* $p < .05$, ** $p < .01$

MTD ; 最高許容用量

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		In National Application No PCT/EP 96/05029
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K/23 A61K47/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 450 461 A (SCHALLY ANDREW VICTOR ;JANAKY TAMAS (HU); JUHASZ ATILLA (HU); BAJU) 9 October 1991 cited in the application see the whole document ---	1,2, 32-36
A	EP 0 624 377 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 17 November 1994 reaction schemes 12, 15, 16, 18 see examples 8,9,14,15,23 see examples 24,28,48,49 see claims; examples 61,70,71 ---	1,32,33
X	US 4 299 822 A (ISRAEL NERVYN ET AL) 10 November 1981 cited in the application see claims; examples ---	1,32,33
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underscore the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 April 1997		Date of mailing of the international search report 29.04.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5811 Patentstrasse 1 NL - 2220 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2044, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 96/05029

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 434 960 A (ERBA CARLO SPA) 3 July 1991 cited in the application see claims; examples ---	1,32,33
X	GB 2 124 224 A (STANFORD RES INST INT) 15 February 1984 see claims; examples ---	1,32,33
X	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 35, no. 17, 21 August 1992, WASHINGTON US, pages 3208-3214, XP002029565 A. CHERIF AND D. FARQUHAR: "N-(5,5-Diacetoxypent-1-yl)doxorubicin: A New Intensely Potent Doxorubicin Analogue" cited in the application see chart 1, Scheme I, scheme III see page 3210, right-hand column, paragraph 4 - page 3212, left-hand column, paragraph 3 ---	1,32,33
X	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 1, no. 5, 1 September 1990, pages 325-330, XP000174625 MUELLER B M ET AL: "ANTIBODY CONJUGATES WITH MORPHOLINODOXORUBICIN AND ACID-CLEAVABLE LINKERS" cited in the application see scheme I and scheme II see page 327, left-hand column, paragraph 1 - page 329, left-hand column, paragraph 2 ---	1,32,33
X	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER AND CLINICAL ONCOLOGY, vol. 20, no. 3, March 1984, pages 421-425, XP000670366 F. ZUNINO ET AL.: "Comparison of Antitumor Effects of Aunorubicin Covalently Linked to Poly-L-Amino Acid Carriers" cited in the application see page 421, right-hand column, paragraph 3 - page 422, left-hand column, paragraph 1 see page 424, left-hand column, paragraph 2 - page 425, left-hand column, paragraph 1 --- -/--	1,32,33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No.
PCT/EP 96/05029

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ANTI-CANCER DRUGS, vol. 5, no. 2, April 1994, pages 115-130, XP000670356 A.V. SCHALLY: "Hypothalamic Hormones: from neuroendocrinology to cancer therapy" cited in the application see page 120, right-hand column, paragraph 2 - page 121, left-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p>	1,2,32, 33
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 79, January 1982, WASHINGTON US, pages 625-629, XP002029566 A. TROUET ET AL.: "A covalent linkage between daunorubicin and proteins that is stable in serum and reversible by lysosomal hydrolases, as required for a lysosomotropic drug-carrier conjugate. In vitro and in vivo studies" cited in the application see figure 1</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 96/05029

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ **Claims Not:** 33-36
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim(s) 33-36
is(are) directed to a method of treatment of the human/animal
body, the search has been carried out and based on the alleged
effects of the compound/composition.
2. ☐ **Claims Not:**
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such
an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ **Claims Not:**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/EP 96/05029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0450461 A	09-10-91	AT 127476 T	15-09-95
		AU 638319 B	24-08-93
		AU 7410691 A	10-10-91
		CA 2039908 A	07-10-91
		DE 69112684 D	12-10-95
		DE 69112684 T	01-02-96
		ES 2076393 T	01-11-95
		IE 63278 B	05-04-95
		JP 4224600 A	13-08-92
		WO 9222322 A	23-12-92
EP 0624377 A	17-11-94	AU 6302694 A	17-11-94
		CA 2123363 A	15-11-94
		CN 1109426 A	22-03-95
		CZ 9401187 A	16-11-94
		FI 942237 A	15-11-94
		HU 66485 A	28-11-94
		JP 7070175 A	14-03-95
		NO 941819 A	15-11-94
US 4299822 A	10-11-81	NZ 260512 A	25-09-96
		CA 1150245 A	19-07-83
		CH 645387 A	28-09-84
		DE 3122689 A	06-05-82
		FR 2483928 A	11-12-81
		GB 2077265 A,B	16-12-81
		JP 1458104 C	09-09-88
		JP 57067596 A	24-04-82
EP 0434950 A	03-07-91	JP 63002440 B	19-01-88
		NL 8102730 A,C	04-01-82
		AT 143023 T	15-10-96
		AU 636429 B	29-04-93
		AU 6919491 A	18-07-91
		CA 2046857 A	20-06-91
		CN 1053238 A,B	24-07-91
		CN 1079215 A	08-12-93
		DE 69028610 D	24-10-96
		DE 69028610 T	06-02-97
		WO 9109046 A	27-06-91

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Is cited Application No

PCT/EP 96/85829

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0434960 A		ES 2094136 T	16-01-97
		FI 97389 B	30-08-96
		HR 921226 A	31-12-95
		HU 209433 B	28-06-94
		IL 96643 A	24-01-95
		JP 4503679 T	02-07-92
		NO 175533 B	18-07-94
		NO 940831 A,B,	14-08-91
GB 2124224 A	15-02-84	US 5304687 A	19-04-94
		US 4464529 A	07-08-84
		AU 1694683 A	26-01-84
		BE 897312 A	18-01-84
		CA 1239396 A	19-07-88
		CA 1233816 C	08-03-88
		CH 655729 A	15-05-86
		DE 3325816 A	26-01-84
		FR 2530640 A	27-01-84
		JP 1606247 C	31-05-91
		JP 2032260 B	19-07-90
		JP 59033278 A	23-02-84
		NL 8302586 A,C	16-02-84
		SE 459921 B	21-08-89
		SE 8304045 A	21-01-84
		US 4826964 A	02-05-89
		US 4585859 A	29-04-86

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AU, BR, CA, CN, CZ, HU, IS, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, SK, UA

(72)発明者 アッティラ エー ナギー

アメリカ合衆国 70112-2699 ルイジアナ
ニュー オリーンズ テュレーン ア
ヴェニュー 1430 テュレーン ユニヴァ
ーシティ メディカル センター スクー
ル オブ メディシン内

(72)発明者 レンジー カイ

アメリカ合衆国 70112-2699 ルイジアナ
ニュー オリーンズ テュレーン ア
ヴェニュー 1430 テュレーン ユニヴァ
ーシティ メディカル センター スクー
ル オブ メディシン内

【要約の続き】

である。R及びPがHである場合には、R'はNH₂以外のものである。新規合成反応は、この研究の途中で、ビスナル又はディスジャンクトの、即ち α 、 β -又は α 、 γ -ヒドロキシ第一アミンから部分的に飽和した複素環式基を形成することが発見された。Q₁は、DOXであり；Q₂は、3'-デアミノ-3'-(ピロリジン-1"-イル)-ドキシソルピシン(AN181)であり；Q₃は、3'-デアミノ-3'-(イソインドリン-1"-イル)-ドキシソルピシン(AN184)であり；Q₄は、3'-デアミノ-3'-(3"-ピロリン-1"-イル)-ドキシソルピシン(AN185)であり；Q₅は、3'-デアミノ-3'-(3"-ピロリドン-1"-イル)-ドキシソルピシン(AN191)であり；Q₆は、3'-デアミノ-3'-(2"-ピロリン-1"-イル)-ドキシソルピシン(AN201)であり；Q₇は、3'-デアミノ-3'-(3"-ピペリドン-1"-イル)-ドキシソルピシン(AN195)であり；Q₈は、3'-デアミノ-3'-(1", 3"-テトラヒドロピリジン-1"-イル)-ドキシソルピシン(AN205)である。Q₁¹⁴gLは、AN152であり；Q₆¹⁴gLは、AN207であり；Q₁¹⁴gSは、AN162であり；Q₆¹⁴gSは、AN238であり；Q₁¹⁴gBは、AN160であり；Q₆¹⁴gBは、AN215である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)